

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; NOBORU ARIYAMA, Niigata; KIKO GOTO, Kyoto; KIKUNAE IKEDA, Tokyo; KATSUJI INOUE, Sendai; SHIGERU TODA, Hoken; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHIKO KOIZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; KAORU OGURO, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; KENZO SUTO, Kanazawa; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUJI SUYEOSHI, Tokyo; MASAJI TOMITA, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIYOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

QP
501
J67

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

Reprinted by
TOA BOOK EXPORTS, INC.

Tokyo Kosho Kaikan Building
Kanda Ogawa-cho 3-22, Tokyo
CABLE: Toaperiodical, Tokyo
PHONE: Tokyo 291-1448

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; NOBORU ARIYAMA, Niigata; KIKO GOTO, Kyoto; KIKUNAE IKEDA, Tokyo; KATSUJI INOUE, Sendai; SHIGERU TODA, Hoten; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHIKO KOIZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; KAORU OGURO, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; KENZO SUTO, Kanazawa; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUUJI SUYEVOSHI, Tokyo; MASAJI TOMITA, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

VOLUME XVIII

TOKYO

1933

COPYRIGHT 1933

BY

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

PUBLISHED BY THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

CONTENTS TO VOLUME XVIII.

No. 1, July, 1933.

	Page
TANAKA, Keizo. Über die Sterine des Reisembryos. (II). Ergosterin und Vitamin D	1
TANAKA, Keizo und TANAKA, Toshiyuki. Über die Gallensäurebildung. VI. Reisembryo und Gallensäureausscheidung	15
MUNEMURA, Sammatsu. Beiträge zum Studium der Phosphatasen und über die phosphatatische Hämolyse	23
TANAKA, Toshiyuki. Die Bedeutung der Gallensäure im Kohlehydratstoffwechsel. XXVIII. Glykocholie bei Zufuhr von Ergosterin und seinem Benzoat und das vegetative Nervensystem	33
OKII, Isokichi. Über den Einfluss der Gallensäure auf den Calciumstoffwechsel. VII. Die Calcium- und Phosphorsäurebilanz der Hündin bei Zufuhr von Gallensäure	45
TAKATA, Hiroshi. Einfluss der Gallensäure auf die enzymatische Spaltung von Lecithin	63
OKUDA, Yuzuru and OGAWA, Masayoshi. On the method of quantitative estimation of glutathione in tissues	75
ICHIHARA, Masao. Über die Phosphamidase	87
HAYASIDA, Atusi. The non-solvent space of the serum and the chlorine bound by the serum protein	107
OHMIYA, Seiichi. Über die fermentative Hydrolyse der Hexosidphosphorsäureester	125
KUMON, Teki. Chemie der Gastropodeneier	145
FUJIWARA, Hidekatsu. Über die Farbenreaktionen von Strychnin und Strychninnitrat	153
NAMIKI, Seishiro. Über den Cholesterin-Gehalt der Muskulatur von Fischen	163

No. 2, September, 1933.

MALHOTRA, R. C. A contribution to the biochemistry of seed germination with particular reference to zeo mays	173
MALHOTRA, R. C. A contribution to the biochemistry of the wheat plant	199
URAKI, Ziro. Bedeutung über Gallensäure im Kohlehydratstoffwechsel. XXIX. Über den Einfluss der Gallensäure auf die Gewebsoxydation und auf die Kohlenhydratverbrennung	207
KUSUI, Kenzo. Beiträge zur Cholesterinbestimmung im Blut. I. Kritische Bemerkungen über einige Extraktionsmethoden und eine vereinfachte gravimetrische Bestimmungsmethode	227

KUSUI, Kenzo. Beiträge zur Cholesterinbestimmung im Blut. II. Über die Kombination der kolorimetrischen mit der Digitoninmethode	237
MIZUSAWA, Hitoshi. Beiträge zur Kenntnis der Alkoholoxydase	243
MASAMUNE, Hajime. Biochemical studies on carbohydrates. I. A micromethod of determination of menthol-, borneol- and β -naphthol-glucuronic acid in blood	259
MASAMUNE, Hajime. Biochemical studies on carbohydrates. II. A microcolorimetric method of determination of free and conjugated methol in blood and tissues	277
TOMIYAMA, Tetuo. Studies on the stick antimony electrode. I. The degree of stability of electrode potential and its effect on the relation between pH and E.M.F.	285
NOMURA, Kentaro. Some notes on the calomel electrode	301
YAMASAKI, Kazumi. Beiträge zur Kenntnis der Hammarstensen reaktion der Cholsäure	311
YAMASAKI, Kazumi. Vorkommen der Taurocholsäure in der Hühnergalle	323
SMORODINZEW und ADOWA, A. N. Die Wirkung von Pepsinpräparaten verschiedener Aktivität auf Muskelglobuline und Kollagen	325
KITAGAWA, Matsunosuke and MONOBE, Shin-ichi. Studies on a diamino acid, canavanin. III. The constitution of canalin	333

No. 3, November, 1933.

KUSUI, Kenzo. Beiträge zur Bestimmung der Blutgallensäuren. II. Mitteilung. Eine neue in der Praxis leicht ausführbare Bestimmungsmethode der Gallensäuren im Blutserum	345
TANAKA, Toshiyuki. Einfluss der Milz auf die Gallen- und Gallensäureausscheidung	369
MIYAZAKI, Masaki. Studies on the diazo-body in typhoid urine	379
MAKINO, Hiroshi. Der Einfluss der Temperatur auf den Eiweissstoffwechsel. II. Die stickstoffhaltigen Extraktivstoffe der Krötenleber während der Winterzeit	387
KOTAKE, Y. sr., KOTAKE, Y. jr. und TANIGUCHI, I. Zum Desaminierungsvorgang der Aminosäuren im tierischen Organismus	395
KURANAMI, Teikichi. Klinische und experimentelle Untersuchungen über Bromstoffwechsel. II. Über Beziehungen zwischen Blutbromgehalt und innerer Sekretion	417
YAMAZOYE, Samuro. Influence of glutathione and monoiodoacetic acid on the production of lactic acid from hexosediphosphoric acid by animal tissues	445
GAMO, Yoshio. On the toxicity of urine and serum proteic acid fraction	457
ISHIDA, Inao. Über den Calcium- und Phosphorstoffwechsel. Einfluss des Carotins und Gallosterins	479

ÜBER DIE STERINE DES REISEMBRYOS. (II) Ergosterin und Vitamin D.

VON

KEIZO TANAKA.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut zu Okayama.
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 29. März 1933.)

Seit Windaus und Hess (1926) und Rosenheim und Webster (1927) ist bekannt, dass das Ergosterin durch Bestrahlung mit ultravioletten Strahlen in einen antirachitisch höchst wirksamen Stoff, in Vitamin D, übergeführt wird. Neuerdings wurde durch die hervorragenden Arbeiten von Windaus (1931) und seinen Mitarbeitern (1930–1931) das Vitamin D in einem kristallisierten Zustande erhalten.

Durch die spektrographischen Untersuchungen und Tierexperimente vieler Autoren, wie Heilbron, Kamm und Morton (1927), Rosenheim und Webster (1927), Bills und Honeywell (1928), Windaus und Hess (1927) und Pohl (1926–1927) ist klar geworden, dass das Cholesterin im tierischen Organismus in ganz geringen Spuren Ergosterin als Provitamin D enthält, welches durch die Ultraviolettstrahlen eine stark antirachitische Wirkung entfaltet. Küster und Hörth (1928) sollen das Ergosterin aus dem Rinderblut im kristallisierten Zustande gewonnen haben. Von Fraser und Gardner (1910) konnte aber im Kaninchenblut nach Phytosterinfütterung kein Phytosterin gefunden werden. Der tierische Organismus nimmt das Ergosterin mit anderen Phytosterinen als vegetabilische Nahrung auf und kann es wohl infolge der Bestrahlung mit Sonnenlicht als Vitamin D im Körper behalten.

Im Pflanzenreich kommt das Ergosterin reichlich in Mutterkorn (1908), in Hefe (1923) und in Pilzen (1913, 1928) vor. Es ist bemerkenswert, dass nach Steenbock und Black (1924–1925), Hume und Smith (1926) Lanolin und Leinöl und nach

Rosenheim und Webster (l. c.) Cholesterin, Stigmasterin, Sitosterin usw. bei der Bestrahlung mit ultravioletten Strahlen stark antirachitisch wirksam werden, indem das beigemengte Ergosterin in Vitamin D umgewandelt wird. Somit dürfte wohl das Ergosterin oder Vitamin D mit anderen Sterinen in der pflanzlichen Nahrung enthalten sein.

Was das Ergosterin im Reisembryo anbetrifft, so war es ganz unbekannt. Und es war eine wichtige Aufgabe, das Ergosterin im Reisembryo zu erforschen, weil dieser von Japanern als Quelle von antineuritischem Vitamin mit Reis sehr gern aufgenommen wird.

Durch spektrographische Untersuchungen und Tierexperimente wurde nun gefunden, dass das Ergosterin im Reisembryo enthalten ist.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

1. Spektrographische Untersuchung.

Das kristallisierte Steringemisch von 3-6 Fraktionen (Tabelle I der I. Mitt. Tanaka, 1933) wurde vereinigt. Wie schon in der ersten Mitteilung angegeben wurde, zeigt das Steringemisch verschiedene Farbenreaktionen, woraus sich auf das Vorhandensein von Ergosterin schliessen lässt.

Bei der Tortelli-Jaffeschen Bromreaktion wird die Farbe erst gelblich grün, hellgrün und dann dunkelgrün, bei der Rosenheimischen Reaktion mit Chloralhydrat erst schwach karminrot, dann grün mit blauem Ton, bei der Trichloressigsäure-Reaktion schwach rosarot, dann blau, und bei der Antimontrichloridreaktion erst purpurrot, dann allmählich blau. Das Steringemisch, das in Äther mit Ultraviolettstrahlen 5 Stunden lang bestrahlt wurde, zeigt eine Anilinsalzsäurereaktion nach Shear (1926). Bei diesem bestrahlten Steringemisch tritt die Tortelli-Jaffesche Reaktion sehr schwach und langsam auf. Das aus Alkohol mehrmals umkristallisierte Steringemisch und das durch Bromierung gereinigte Sitosterin zeigen natürlich keine Tortelli-Jaffesche Reaktion. Dies beweist, dass nach Rosen-

heim und Webster (l. c.), MacLean und Thomas (1920) und Rosenthal (1922) die Phytosterine, die durch Überbestrahlung mit Ultraviolettstrahlen oder durch Bromierung von Ergosterin befreit wurden, keine antirachitische Wirkung zeigen.

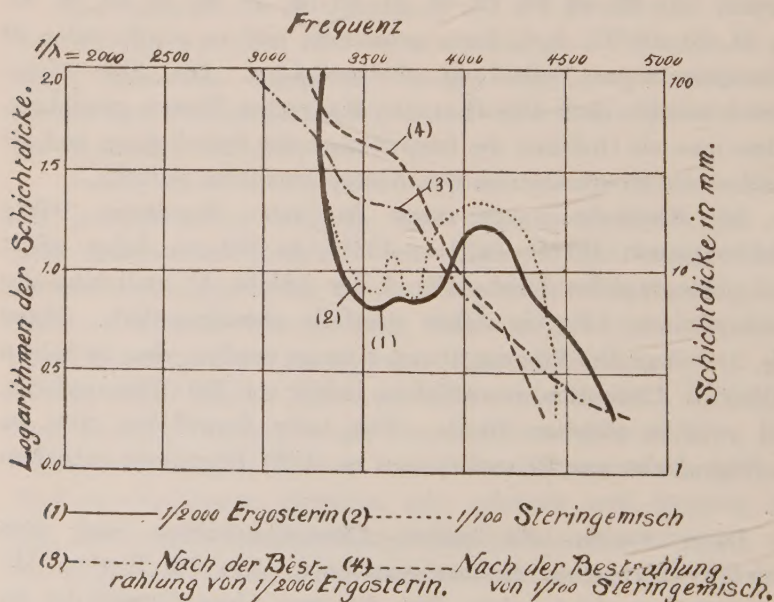
Das Spektrogramm des Ergosterins und seine Veränderung durch Ultraviolettstrahlen wurde von vielen Autoren, wie Rosenheim und Webster (l. c.), Bills und Honeywell (l. c.), Heilbron, Kamm, und Morton (l. c.), Windaus und Hess (l. c.), Pohl (l. c.) und Smacula (1928) eingehend untersucht. Dadurch konnte nicht nur die Existenz von Ergosterin im Steringemisch, sondern auch sein Mengenverhältnis gezeigt werden.

Zum Versuch wurde der Quarzspektrograph von Adam-Hilger (Typus E₃) und die "Ilford special rapid panchromatic plates" gebraucht, sodass ohne Schwierigkeit das Ultraviolettgebiet bis etwa $\lambda=2100$ hin photographiert werden konnte. Als Lichtquelle diente der Eisenbogen 100 Volt, 45 Amp., dessen zahlreiche Absorptionslinien bekanntlich das Ablesen von Absorptionsenden auf der negativen Platte wesentlich erleichtern. Als Schichtdicke wurden 100, 92, 84, 76, 72, 68, 64, 60, 56, 52, 48, 44, 40, 36, 32, 28, 24, 20, 16, 12, 8, 4, 2 mm gebraucht, und es wurde unter 40 Sekunden langer Belichtung photographiert. Die Absorptionskurven wurden nach dem Hartley-Balyschen System gezeichnet, indem man als Ordinate die Logarithmen der Schichtdicke und als Abszisse die Frequenzen an den Absorptionsenden auftrug.

Als Kontrolle wurde zuerst das reine Ergosterin, 0.05 g (Schmelzpunkt 161°C. $[\alpha]_D^{20} = -132^\circ$), in 100 ccm Äther gelöst und photographiert (Siehe Fig. 1 der Abbild. 1) und dann das Steringemisch, 1.0 g, in Äther ebenfalls photographiert. (Siehe Fig. 2). Aus den Figuren 1 und 2 ist zu ersehen, dass in beiden Fällen die Absorption wesentlich im Gebiet von 260–310 μ auftritt, und zwar in gleichem Grade. Dies weist darauf hin, dass im Steringemische aus Reisembryonen ca. 1/20 Ergosterin enthalten ist.

Dann wurden die beiden Absorptionskurven nach dem Hartley-Balyschen System gezeichnet. Aus den Kurven (1) und (2) lässt sich ersehen, dass die zwei Absorptionsbänder im

ultravioletten Gebiete als fast übereinstimmend zu betrachten sind. Es treten hierbei zwei Absorptionsbänder mit dem Maximum bei 3715, bzw. 3555 auf. Obwohl die Absorptionskurven des Steringemisches verglichen mit denen der Kontrolle etwas hypochromisch erscheinen, so sind doch die beiden in der Lage des Absorptionsbandes sowie in der Form der Absorptionskurven dann unterscheidbar. Dies beweist, dass im Steringemisch aus Reisembryonen eine Substanz enthalten sein dürfte, die eine mit der des Ergosterins fast identische Adsorptionskurve besitzt. Weiter wurden das reine Ergosterin und das Steringemisch in Äther in offener Glasschale mit der Quarzlampe von Hanau (100 Volt und 7,5 Amp.) in 25 cm Entfernung 6 Stunden lang bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die beiden gelblich gefärbten Lösungen unter den gleichen Bedingungen spektrographisch photographiert, (Fig. 3 und 4) und ihre Absorptionskurve aufgezeichnet. (Kurve 3 und 4). Aus den Kurven und Figuren ist ersichtlich, dass die zwei vor der Bestrahlung typischen Absorptionsbänder verschwunden sind, und zwar das beim bestrahlten Ergosterin von 3400 bis 3680 (3) und das



beim bestrahlten Steringemisch von 3450 bis 3650 (4), die beide fast in horizontalen Linien auftraten. Die Kurve des Steringemisches verschiebt sich etwas hypochromisch gegenüber der der Kontrolle. Aus diesem Ergebnis geht hervor, dass im Steringemisch eine Substanz, die genau wie das Ergosterin durch die Ultraviolettstrahlen veränderbar ist, beigemischt vorhanden ist.

Aus allen obengenannten Ergebnissen kommt man wohl zu dem Schlusse, dass der Reisembryo das Ergosterin als Provitamin D enthält, und dass es ca. $1/20$ von dem gesamten Steringemisch beträgt.

Abb. I.

Fig. 1.

(1/2000 Ergosterin)

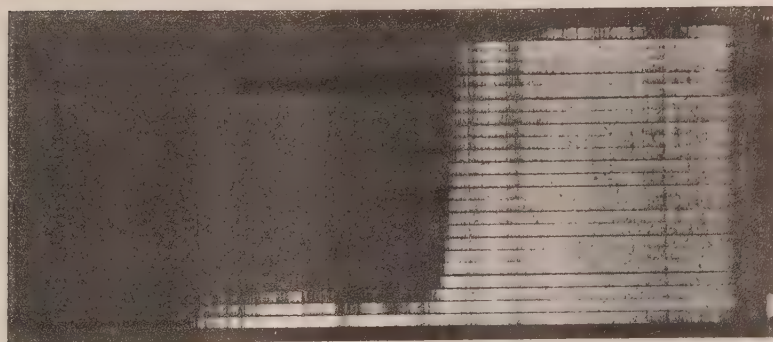


Fig. 2.

(1/100 Steringemisch)

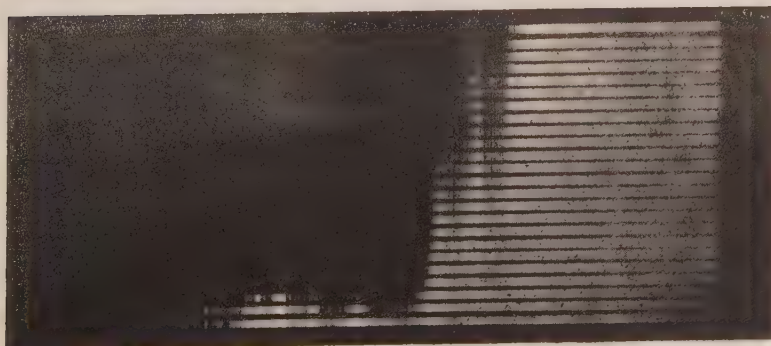


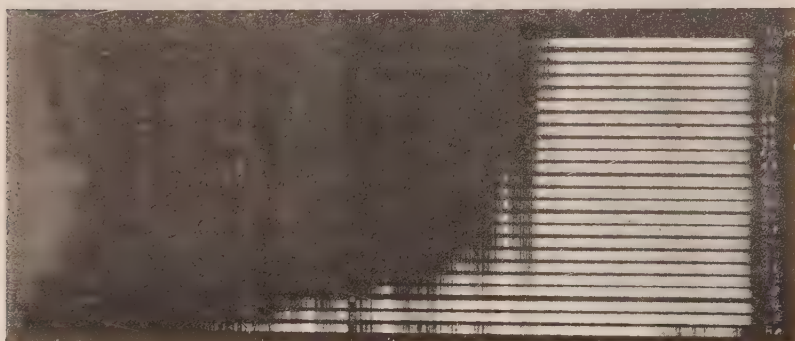
Fig. 3.

(Nach der Bestrahlung von 1/2000 Ergosterin)



Fig. 4.

(Nach der Bestrahlung von 1/100 Steringemisch)



2. Biologischer Versuch über das antirachitische Vitamin im Reisembryo.

Was die fettlöslichen Vitamine A und D der Getreidearten, bzw. deren Embryonen, anbetrifft, so wurde von vielen Autoren, wie Steenbock und Coward (1927) und Sure (1928) im Weizenembryo Vitamin A durch biologische Versuche nachgewiesen und im Endosperm viel reichlicher als im Embryo gefunden.

Nach Schittenhelm und Eisler (1931) und Mellanby (1929) enthalten die Wurzelkeime der Gerste sowie das Ergot des Roggens eine antirachitische oder den Verknöcherungsvorgang fördernde Substanz, die nach Mellanby in wachsenden Pflanzen

aus Ergosterin unabhängig von Ultraviolettstrahlen gebildet wurde. Ausserdem haben Schittenhelm und Eisler Ergosterin im Gerstenkeime spektrographisch nachgewiesen. Der Beweis von Schulz und Barbieri (1882) und Täufel und Rusch (1929), dass bei der Gerstenkeimung eine unverseifbare Substanz, bzw. Sterin, vermehrt wird, lässt vermuten, dass sich Ergosterin bildet, welches in Vitamin D umgewandelt wird.

Der Reis mit dem Reisembryo wird als essentieller Vitamin-B-Träger der Nahrung gern von uns aufgenommen. Was das Vitamin A im Reisembryo anbetrifft, so wurde es von Miki (1933) durch biologische Versuche mit Ratten nachgewiesen, während das Vitamin D im Reisembryo, soweit ich die Literatur durchgesehen habe, noch unbekannt ist. Daher habe ich mich unter Verwendung von Ratten mit dem biologischen Nachweis von Vitamin D im Reisembryo beschäftigt und gefunden, dass das mit Ultraviolettstrahlen bestrahlte Steringemisch sowie sein unverseifbarer syrupöser Anteil aus dem Reisembryo eine antirachitische Wirkung haben, was die Gegenwart von Provitamin D im Reisembryo bedeutet.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

Zu den Versuchen benutzte ich junge weisse Ratten mit dem Körpergewicht von 28–40 g. 24 Ratten wurden in 3 Gruppen geteilt und in gesonderten Käfigen im Dunkeln bei 18–23°C gehalten. Der ersten Gruppe der Ratten wurde die folgende McCollumsche Kost Nr. 3143 (1921) im bestimmten Mengenverhältnisse verabreicht. Sie bestand aus: 33 g Weizenmehl, 33 g ganzen Maiskörnern, 15 g pulverisierter Gelatine, 15 g gebackenem Weizenprotein (Yakifu), 1 g Kochsalz, und 3 g Kalziumkarbonat. Alles dies wurde mit Wasser zu einer Kugel durchgeknetet, und man liess es von den Ratten ruhig fressen. Dazu wurde den Tieren noch genug Wasser gegeben. Der zweiten Gruppe wurde dieselbe Nahrung mit täglich 0.01 g des mit Ultraviolettstrahlen bestrahlten Steringemisches gegeben. An die dritte Gruppe wurde dieselbe Nahrung mit pro die 0.3–0.5 mg der unverseifbaren syrupösen Masse aus Reisembryonen verfüttert, die von den mit Digitonin

fällbaren Sterinen befreit worden war. Die Masse zeigt die Shearsche Farbenreaktion, wie es bei Vitamin D der Fall war. Das Körpergewicht der Tiere wurde alle 3 Tage festgestellt und ihr Wachstum genau beobachtet. Während des Versuches wurden die rachitischen Veränderungen der Ober- und Unterschenkelknochen röntgenologisch beständig kontrolliert. Zu besserem Verständnis werden die Ergebnisse in der folgenden Tabelle I zusammengefasst.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Verfütterung des bestrahlten Steringemisches oder des unverseifbaren syrupösen Öls imstande ist, den Ausbruch der Rachitis zu verhüten.

Um die Heilwirkung des bestrahlten Steringemisches oder des unverseifbaren syrupösen Öls aus Reisembryonen festzustellen, wurde es in derselben Menge mit McCollumscher Kost Nr. 3143 an die rachitischen Ratten verfüttert, nachdem die rachitischen Veränderungen der Knochen röntgenologisch festgestellt worden waren; dann wurde weiter genau wie vorher beobachtet. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle II zusammengefasst.

Aus dem Ergebnisse lässt sich zeigen, dass es leicht und schnell gelingt, schwere Rachitis der Ratten durch Verfütterung des bestrahlten Steringemisches oder des unverseifbaren syrupösen Öls aus Reisembryonen zu heilen, obwohl die Anzahl der Versuche nicht ausreichend ist.

Aus den Ergebnissen der Tabelle I und II geht hervor, dass die Verfütterung des bestrahlten Steringemisches oder des unverseifbaren syrupösen Öls aus Reisembryonen bei den jungen Ratten nicht nur die Rachitis verhütet und heilt, sondern auch das Wachstum fördert und die allgemeinen Erscheinungen, d. h. Ausfall und Glanzlosigkeit des Haares, Tränensekretion und Lichtscheu bessert, welche letztere wohl von dem Mangel an Vitamin A in der Nahrung herrühren, was schon von Miki (l. c.) bewiesen wurde.

Aus den Ergebnissen lässt sich der Schluss ziehen, dass im Reisembryo nicht nur Vitamin B, sondern auch Vitamin A und D enthalten sind. (Zum Schlusse möchte ich nicht verfehlen, den Herren Dr. S. Akai und K. Nakano für ihre freundliche Unterstützung bei dieser Arbeit ergebenst zu danken.)

TABELLE I.

Nr. der Ratten.	Versuchsdauer. (Tage)	Körpergewicht (g)			Zusatz mit Kost Nr. 3143.	Röntgenologisch rachitische Knochenveränderungen.		Mortalität während d. Versuchs. (%)	Allgemeine Erscheinungen.
		Anf.	Ende	Zunahme (%)		am 21. Tage.	am 30. Tage.		
4	30	38	46	21.06	Ohne	(+)	(+ +)	75	Später schwächlich, zitterig, Tränen- sekretion, Lichtscheu, Ausfall und Glanz- losigkeit des Haares usw.
7	"	33	40	21.22	"	(+ +)	(+ + +)		
9	"	31	43	38.71	Bestrahltes Steringemisch 0.01 g pro Tag.	(-)	(-)	50	
11	"	33	47	42.42		(-)	(-)		
14	"	29	39	34.50		(-)	(-)		Munter und gut fressend.
16	"	36	52	44.44		(-)	(-)		
17	"	37	53	43.24	Unverseifbares Öl 0.3—0.5 mg pro Tag.	(-)	(-)	25	
19	"	28	42	50.00		(-)	(-)		
20	"	35	50	42.86		(-)	(-)		fressend. Munter und gut fressend.
21	"	36	54	50.00		(-)	(-)		
23	"	30	44	46.66		(-)	(-)		
24	"	29	41	41.40		(-)	(-)		

TABELLE II.

Nr. der Ratten.	Versuchsdauer. (Tage)	Körpergewicht (g)			Zusatz mit Kost Nr. 3143.	Röntgenogramm		Allgemeine Erscheinungen	
		Anf.	Ende	Zunahme (%)		Anfangs	Ende	Anfangs	Ende
4	40	46	75	63.05	Bestrahtes Steringemisch 0.01 g pro Tag.	(+ +)	(-)	Schwächlich, zitterig, Trä- nensekretion, Lichtscheu, Ausfall und Glanzlosigkeit des Haares.	Allmählich gebessert und ganz geheilt.
7	47	47	76	61.70	Unverseif- bares Öl 0.3-0.5 mg pro Tag.	(+ + +)	(-)		

Abb. II.

Fig. 1.

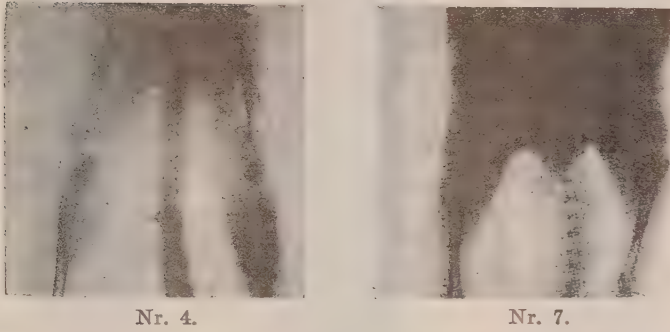


Fig. 1. Nr. 4, 7. Röntgenologischer Film von Ratten, gezüchtet mit der Rachitis-Nahrung allein, 21 Tage lang (Nr. 4) und 30 Tage lang (Nr. 7). Es zeigt sich rachitische Knochenveränderung.

Fig. 2.

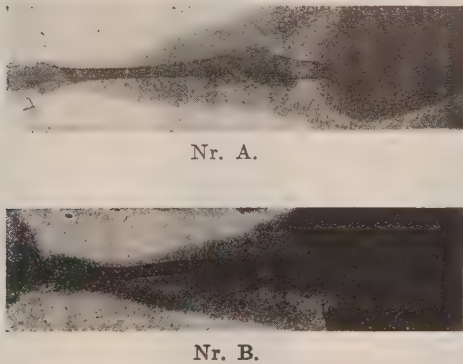


Fig. 2. Nr. A, B. Röntgenologischer Film von denselben Ratten, nach Verfütterung von bestrahltem Steringemisch, 0.01 g pro Tag, mit der Rachitis-Nahrung, 40 Tage lang (Nr. A) und von unverseifbarem Öl, 0.3–0.5 mg pro Tag, mit der Rachitis-Nahrung 30 Tage lang (Nr. B). Es zeigt sich keine rachitische Knochenveränderung.

Fig. 3.



Nr. 9.



Nr. 11.



Nr. 14.



Nr. 17.



Nr. 20.



Nr. 24.

Fig. 3. Nr. 9, 11, 14, 17, 20, 24. Röntgenologischer Film von Ratten, gezüchtet mit der Rachitis-Nahrung und dem bestrahlten Steringemisch, 0.01 g pro Tag, 21 Tage lang (Nr. 9, 11, 14) und dem unverseifbaren Öl, 0.3–0.5 mg pro Tag, 30 Tage lang (Nr. 17, 20, 24). Es zeigt sich keine rachitische Knochenveränderung.

LITERATUR.

- Bills, C. E. u. Honeywell, E. M. (1928): *Jl. of Biol. Chem.*, **76**, 251.
 Bourdillon, R. B. (1930–1931): *Proc. Royal Soc. London, B.*, **107**, 76 u. 108, 508.
 Fraser, M. T. u. Gardner, J. A. (1910): *Proc. Royal Soc. London*, **82**, 559.
 Heilbron, I. M., Kamm, E. D. u. Morton, R. A. (1927): *Bioch. Jl.*, **21**, 78.
 Hume, E. M. u. Smith, H. H. (1926): *Bioch. Jl.*, **20**, 340.
 Küster, W. u. Hörth, O. (1928): *Ber. Chem.*, **61**, 809.
 MacLean, I. S. u. Thomas, E. M. (1920): *Bioch. Jl.*, **14**, 483.
 McCollum, E. V., Simmonds, N., Shipley, P. G. u. Park, E. A. (1921): *Jl. of Biol. Chem.*, **47**, 507.
 Mellanby, E. (1929): *Bioch. Jl.*, **23**, 710.
 Miki, T. (1933): *Arb. Med. Univ. Okayama*, **3**, 501.
 Pohl, R. (1926–1927): *Nachr. Ges. Wiss. Göttingen*, 142 u. 185.
 Rosenheim, O. u. Webster, T. A. (1927): *Bioch. Jl.*, **21**, 389 u. 127.
 Rosenthal, R. (1922): *Monath. f. Chem.*, **43**, 237.
 Schittenheim, A. u. Eisler, B. (1931): *Zeitschr. f. exp. Med.*, **75**, 737–766.
 Schulz, B. u. Barbieri (1882): *Jl. prakt. Chem.*, **25**.
 Shear, M. J. u. Kamer, B. (1926): *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **23**, 546.
 Smacula (1928): *Nachr. Ges. Wiss. Göttingen*, 49, Zitiert von Windaus, A. (1931): *Liegigs Ann.*, **489**, 253.
 Steenbock, H. u. Black, A. (1924–1925): *Jl. of Biol. Chem.*, **61**, 405 u. **64**, 263.
 Steenbock, H. u. Coward, K. H. (1927): *Jl. of Biol. Chem.*, **72**, 765.
 Sumi, M. (1928): *Proc. Imp. Acad. Tokyo*, **4**, 116.
 Sure, B. (1928): *Jl. Agric. Res.*, **37**, 87.
 Tanaka, K. (1933): *Jl. of Bioch.*, **17**, 483.
 Tanret, C. (1908): *C. R.* **147**, 75.
 Täufel, K. u. Rusch, M. (1929): *Bioch. Zeitschr.*, **209**, 55.
 Windous, A. u. Hess, A. (1926): *Nachr. Ges. Wiss. Göttingen*, **75**.
 „ (1927): „ **175**.
 „ (1927): *Proc. Soc. exp. Biol. u. Med.*, **24**, 369.
 Windaus, A. (1931): *Liebigs Ann.*, **489**, 252.
 Windaus, A. u. Grosskopf, W. (1923): *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, **124**, 9.
 Zellner, J. (1913): *Monath. f. Chem.*, **34**, 321.

ÜBER DIE GALLENSÄUREBILDUNG. VI. Reisembryo und Gallensäureausscheidung.

VON

KEIZO TANAKA UND TOSHIYUKI TANAKA.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut zu Okayama.
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 29. März 1933.)

Auf Grund dessen, dass die Gallensäurebildung in der Leber mit den Nahrungsbestandteilen bzw. Sterinen in innigem Zusammenhang steht, wurde seit Yonemura (1927) und Sugano (1927) die Gallensäureausscheidung aus der Leber von vielen Autoren wie Murakami (1928), Higashi (1930–32), Fuziwara und Fukase (1932) durch Verfütterung von unverseifbaren Anteilen des Nahrungsfettes, bzw. Ergosterin oder Vitamin D, oder durch Verabreichung einer solche Sterine enthaltenden Nahrung, z. B. eines Pilzes, Shiitake oder von Okara aus Sojabohnen, untersucht und gefunden, dass diese Stoffe die Gallensäureausscheidung vermehren.

Nach obigen Autoren soll die Gallensäure aus einem Sterine der Ergosterinreihe herkommen, weil einerseits die Gallensäure und ihre Derivate (1932, 1933) durch Bestrahlung mit Ultraviolettstrahlen optisch verändert werden, andererseits sich die Gallensäure der Krötengalle (1931) von erwachenden und den Winterschlaf haltenden Tieren optisch ganz umgekehrt verhält. Genau wie Gallensäure wird das optisch linksdrehende Ergosterin durch Bestrahlung mit Ultraviolettstrahlen in das rechtsdrehende Vitamin D umgewandelt, und dieses Sterin ist als wichtiger Bestandteil in der Nahrung enthalten, wie von Windaus und seinen Mitarbeitern (1931) bewiesen wurde.

Einer von uns (K. Tanaka, 1933, ii) hat ein kristallisiertes Steringemisch, welches Ergosterin enthält, und syrupöses Öl, das die Vitamin A und D enthält, aus den unverseifbaren Anteilen vom alkoholischen Extrakt des Reisembryos gewonnen. Einerseits um seine Befunde sicher zu stellen und andererseits um zu der Frage

der Gallensäurebildung in der Leber einen Beitrag zu liefern, wurde die Gallensäureausscheidung in der Galle des eine Gallenblasenfistel tragenden Hundes durch Verfütterung des oben genannten bestrahlten Steringemisches oder des von Ergosterin befreiten Steringemisches oder des syrupösen Öls aus Reisembryo untersucht und gefunden, dass sie alle mit der Ausnahme des von Ergosterin befreiten die Gallensäureausscheidung des Fistelhundes fördern können.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Methodik.

Zuerst wurde den Hunden eine permanente Gallenblasenfistel nach Dastre angelegt, und zwar wurde der Ductus Choledochus immer an zwei Stellen doppelt unterbunden. Nachdem die Hunde sich von der Operationswunde erholt hatten, wurden sie zum Versuche verwendet. Während des Versuches wurde der Bauch des Hundes mit Leinwand umwickelt, die die zwecks Sammlung der Galle mit der Gallenblasenfistel verbundene Glaskugel trug; So konnte der Hund auf derselben ausruhen. Auch liess man während des Versuches die Hunde ruhig ihre eigene aus der Fistel abfliessende Galle ablecken. Da die Nahrungsaufnahme und die Art der Nahrung auf die Menge der ausgeschiedenen Galle von Einfluss sind, so diente als Futter eine bestimmte Menge Reis, fettarmes Fleisch, Shoyusuppe aus Sojabohnen und Gemüse. Diese Nahrung wurde einmal täglich um 3 Uhr nachmittags verfüttert. Die Galle wurde 6 Stunden lang (von 9 Uhr morgens bis 3 Uhr nachmittags) in Kugeln gesammelt. Das Material aus Reisembryo wurde um 3 Uhr mit der Speise zusammen den Hunden verabreicht und sein Einfluss auf die Galle- und Gallensäureausscheidung beobachtet. Die Gallensäuremenge in der Galle wurde durch die gasometrische Methode nach Foster und Hooper (1919) immer doppelt bestimmt.

1. Versuch mit bestrahltem Steringemisch aus Reisembryo.

Das Steringemisch, welches, wie durch Farbenreaktion, spek-

trographische Untersuchung und biologische Versuche bewiesen wurde, Ergosterin (ca. 1/20 von dem Steringemisch) enthält, wurde in Chloroformlösung mit der Quarzlampe von Hanau (100 Volt und 7.5 Amp.) in 25 cm Entfernung 6 Stunden lang bestrahlt. Erst nach 10 Minuten Bestrahlung wurde die Lösung schwach gelblich, und diese gelbe Färbung nahm allmählich mit der Zeit der Bestrahlung zu. Nach der Bestrahlung wurde das Chloroform im Vakuum bei Zimmertemperatur verdunstet, und der gelbliche Rückstand mit Alkohol umkristallisiert. Dadurch erhielt man eine syrupöse Masse, von der 0.3–0.40 g pro Tag mit der Speise an die Hunde verfüttert wurden. Diese Masse gab prachtvolle Shear's Anilinsalzsäurereaktion, was auf die Gegenwart von Vitamin D hindeutet. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle I zusammengefasst.

TABELLE I.

Versuch 1.

Hund P. (K.G. 9 kg) 22/XI Operation.

Datum	Ausgeschiedene Gallenmenge (cem)	Spez. Gew.	Taurocholsäure in 6 Stunden (mg)	Bemerkungen
15/I	27	1018	313.59	← Bestrahltes Steringemisch 0.3 g
16	34	1016	302.97	
17	28	1018	273.27	
18	30	1019	367.57	
19	35	1015	349.32	
20	30	1015	292.66	
21	26	1017	251.04	

Versuch 2.

Hund M. (K.G. 10.5 kg) 22/XI Operation.

Datum	Ausgeschiedene Gallenmenge (cem)	Spez. Gew.	Taurocholsäure in 6 Stunden (mg)	Bemerkungen
15/I	41	1016	417.05	← 0.3 g
16	40	1015	406.04	
17	37	1016	415.46	
18	47	1016	482.14	
19	39	1016	420.81	
20	33	1015	374.05	
21	31	1016	385.43	

Versuch 3.

Hund D. (K. G. 13 kg) 21/XII Operation.

25/I	50	1018	692.91	← 0.4 g
26	51	1018	701.72	
27	55	1017	680.42	
28	54	1019	860.66	
29	61	1017	831.59	
30	54	1017	724.38	
31	45	1017	675.21	

Aus den Versuchen 1-3 der Tabelle I lässt sich ersehen, dass die Gallensäuremenge, die im Laufe des Tages allmählich abnimmt, sich durch die Zufuhr von bestrahltem Steringemisch am nächsten Tage vermehrt und dann allmählich wieder abnimmt. Die Zunahme der Gallensäuremenge im Vergleich zu der Menge des vorangehenden Tages beträgt 21-24%.

2. Versuch mit dem unverseifbaren syrupösen
Reisembryoöl.

Bei diesen Versuchen wurde den Hunden einmal 8 ccm eines unverseifbaren syrupösen Reisembryoöls, welches nach den Untersuchungen von Tanaka (1933) und Miki (1933) die Vitamine A und D enthält, mit der Nahrung zusammen verabreicht und sein Einfluss auf die Galle- und Gallensäureausscheidung beobachtet.

TABELLE II.

Versuch 1.

Hund M.

Datum	Ausgeschiedene Gallenmenge (ccm)	Spez. Gew.	Taurocholsäure in 6 Stunden (mg)	Bemerkungen
18/XII	45	1017	614.35	← Reisembryoöl 8 ccm verfüttert.
19	44	1017	611.31	
20	44	1018	600.76	
21	45	1019	691.07	
22	38	1020	635.99	
23	52	1015	628.64	
24	40	1019	592.02	

Versuch 2.

Hund D.

18/XII	34	1015	370.87	
19	35	1017	401.72	
20	35	1016	360.59	
21	36	1018	485.07	← "
22	43	1018	492.78	← "
23	35	1017	311.39	
24	39	1016	282.74	

Versuch 3.

Hund M.

25/I	41	1016	423.52	
26	38	1017	407.53	
27	34	1017	389.23	
28	37	1018	481.30	← "
29	36	1017	339.09	
30	40	1016	374.54	
31	35	1017	328.83	

Versuch 4.

Hund P.

25/I	38	1018	363.64	
26	34	1018	327.23	
27	30	1016	314.73	
28	36	1018	393.81	← "
29	33	1018	377.76	
30	31	1018	323.98	
31	28	1018	295.95	

Die Versuche 1–4 der Tabelle II zeigen, dass die Gallensäurevermehrung viel deutlicher nach Zufuhr von unverseifbarem Reisembryoöl auftritt als nach der von Steringemisch aus Reisembryo, und dass die Gallensäuremenge im Vergleich zu der vom vorangehenden Tage um 13–43% zunimmt. Dieses Ergebnis stimmt gut mit dem von Sugano (1927) und Yonemura (1927) überein, dass die Gallensäureausscheidung durch die Zufuhr von Biosterin

nach Takahashi, welches die Vitamine A und D enthält, bei Menschen und Hunden stark vermehrt wird.

3. Versuch mit dem von Ergosterin befreiten
Steringemisch aus Reiseumbrryo.

Bei diesen Versuchen wurde das Steringemisch anfangs mit ultravioletten Strahlen bestrahlt, und das dadurch entstandene gelblichbraune Öl aus Alkohol mehrmals umkristallisiert, bis es keine Tortelli-Jaffesche Bromreaktion mehr ergab. Dieses von Ergosterin freie Steringemisch 1 g, wurde den Hunden mit der Nahrung zusammen verabreicht und sein Einfluss auf die Gallensäureausscheidung beobachtet. Andererseits wurde das Steringemisch acetyliert und weiter in Ätherlösung mit Bromeisessig bromiert. Dabei trat die bekannte tiefgrüne Farbe nach der Tortelli-Jaffeschen Reaktion auf. Das Bromid wurde mit Eisessig gefällt und debromiert. Diese Behandlung wurde wiederholt, bis die grüne Farbe der Tortelli-Jaffeschen Reaktion ganz verschwand. Das auf diese Weise durch Debromierung und Verseifung gewonnene Steringemisch, 1 g, wurde an die Hunde verfüttert und sein Einfluss auf die Gallensäureausscheidung beobachtet. Dieses von Ergosterin befreite Steringemisch enthält Sitosterin, Stigmasterin und Dihydrositosterin, wie schon einer von uns (K. Tanaka, 1933, i) erwiesen hat.

TABELLE III.

Versuch 1.

Hund P.

Datum	Ausgeschiedene Gallenmenge (ccm)	Spez. Gew.	Taurocholsäure in 6 Stunden (mg)	Bemerkungen
5/XII	40	1015	415.26	← Bestrahltes Steringemisch 1 g.
6	38	1016	375.67	
7	36	1016	394.10	
8	34	1016	350.28	
9	35	1016	362.14	
10	32	1017	323.55	
11	35	1016	345.92	

Versuch 2.

Hund D.

15/I	55	1018	750.18	← "
16	52	1018	712.30	
17	53	1018	730.75	
18	50	1018	692.64	
19	46	1018	650.44	
20	48	1017	703.91	
21	45	1017	660.22	

Versuch 3.

Hund M.

5/XII	48	1017	672.27	← Durch Brom von Ergosterin befreites Sterin- gemisch 1 g.
6	45	1017	638.17	
7	45	1017	659.31	
8	42	1017	621.45	
9	39	1018	594.08	
10	43	1016	643.84	
11	40	1016	611.02	

Versuch 4.

Hund M.

3/II	38	1017	413.51	← "
4	37	1017	380.36	
5	40	1016	362.15	
6	36	1017	344.72	
7	36	1017	373.18	
8	34	1017	315.40	

Die Versuche 1–4 der Tabelle III zeigen, dass die Gallensäuremenge in der Fistelgalle durch die Zufuhr des von Ergosterin befreiten Steringemisches gar nicht beeinflusst wird. Dieses Ergebnis stimmt gut mit dem von Schönheimer (1929) und Higashi (1931) überein.

Aus obenerwähnten Daten geht hervor, dass zwischen der Gallensäurebildung und dem Ergosterin, bzw. dem Vitamin D, ein inniger Zusammenhang besteht.

LITERATUR.

- Bourdillon, R. B. (1931): Proc. Roy. Soc. London, 108 B, 340.
Foster, M. G. u. Hooper, C. W. (1910): Jl. of Biol. Chem., 38, 355-421.
Fuziwara, K. u. Fukase, T. (1932): Jl. of Bioch., 15, 193.
Higashi, S. (1930-32): Arb. Med. Univ. Okayama, 1, 582 u. 2, 398, 566 u. 3, 22.
Kaziro, K.: noch nicht veröffentlicht.
Miki, T. (1933): Arb. Med. Univ. Okayama, 3.
Murakami, K. (1928): Jl. of Bioch., 9, 321.
Schönheimer, R. u. Yuasa, D. (1929): Zeitschr. f. physiol. Chem., 180, 1-37.
Sugano, D. (1927): Jl. of Bioch., 7, 457.
Tanaka (1933, i): J. of Bioch., 17, 483.
„ (1933, ii): Jl. of Bioch., 18, 1.
Uraki, Z. (1932): Zeitschr. f. physiol. Chem., 207, 16.
„ (1933): noch nicht veröffentlicht.
Windaus, A. u. Lüttringhaus, A. u. Deppe, M. (1931): Liebigs Annalen, 489, 252.
Windaus, A. u. Lüttringhaus, A. (1931): Zeitschr. f. physiol. Chem., 230, 70.
Yonemura, S. (1927): Jl. of Bioch., 7, 101.

BEITRÄGE ZUM STUDIUM DER PHOSPHATASEN UND ÜBER DIE PHOSPHATATISCHE HÄMOLYSE.

VON

SANMATSU MUNEMURA.

(Aus dem medizinischen-chemischen Institut der Medizinischen Akademie
zu Chiba. Direktor: Prof. S. Akamatsu.)

(Eingegangen am 1. April 1933)

Die vorliegende Mitteilung behandelt die phosphatatische Hydrolyse der Phosphorsäureester der kernbromierten aromatischen Oxyverbindungen. Asakawa hat bereits beobachtet, dass die optimale Azidität der Phosphomonoesterase vom dritten Typ bei den meisten Estern $\text{pH } 9$ war, und dass falls der Ester sehr leicht hydrolysierbar ist, sich das Optimum nach $\text{pH } 10$ verschiebt. Die für meinen Versuch dargestellten Substrate waren: 1) β -Naphthyl-Phosphorsäure, 2) Tetra-Brom- β -Naphthyl-Phosphorsäure 3) Thymyl-Phosphorsäure, 4) Mono-Bromthymyl-Phosphorsäure und 5) Di-Brom-Thymyl-Phosphorsäure. Wie erwartet sind sie alle durch tierische Phosphomonoesterase schnell aufspaltbar. Das pH -Optimum wurde bei 10 beobachtet.

Die Phosphomonoesterase der Erythrozyten wurde auch geprüft. Die Erythrozytenphosphatase hat Hori kürzlich eingehend untersucht. Nach seiner Angabe sind in den roten Blutzellen zwei Arten von Phosphomonoesterase vorhanden, u. zw. der erste und zweite Typ, aber der dritte nicht. Bei der einfach wasserhämolytierten und dialysierten Erythrozytenlösung ist aber die optimale Azidität, durch die kolloidchemische Labilität des begleitenden Erythrozytenbestandteils bedingt, bei $\text{pH } 5$ zu beobachten. Bei der Hydrolyse der vorliegenden Ester war das auch der Fall. Da die Ester der aromatischen Oxyverbindungen überhaupt leicht hydrolysierbar sind, so geht die Aufspaltung durch die Erythrozytenmonoesterase auch bei neutraler Reaktion ziemlich weit vor sich.

Die kernbromierten aromatischen Oxyverbindungen wirken anderseits an und für sich stark antiseptisch und hämolytisch. Die hämolytische Wirkung wird aber durch Verestern mit Phosphorsäure aufgehoben. Es ist also zu erwarten, dass die Erythrozyten, die in der isotonischen neutralisierten Lösung solcher Ester suspendiert sind, durch die freizumachenden Oxyverbindungen endlich aufgelöst werden können. Die Zeit bis zur beginnenden Hämolyse hängt von der Phosphatasenaktivität der betreffenden Erythrozyten und von der hämolytischen Wirksamkeit der freien aromatischen Alkohole ab. Ein Vorversuch ergab, dass die Erythrozyten der Kaninchen weit phosphatasenreicher als die der Ziegen sind, und dass die Hydrolysierbarkeit der obenerwähnten Ester fast gleich ist. Beim Hämolyseversuch wurde eine $M/100$ Lösung von jedem Ester in physiologischer Kochsalzlösung vorbereitet. Eine 10%ige Suspension der Kaninchen- oder Ziegenerythrozyten wurde zugemischt und in einen Thermostaten von 37° gestellt. Kaninchenerythrozyten in Dibromthymylphosphorsäure lösten sich schon in 1 Stunde auf. Dieselben in Monobromthymylester nach 3 Stunden und in Tetrabromnaphthylester nach 4 Stunden. Ziegenerythrozyten wurden nur in Tetrabromnaphthylester nach 4 Stunden aufgelöst. Ein anderer Hämolyseversuch wurde wie folgt gemacht: Dieselben isotonischen Esterlösungen, die bei den vorangehenden Versuchen gebraucht wurden, wurden mit der Nierenphosphatasenlösung gemischt. Diese Fermentlösung war das mit gleichem Volumen 1.7%iger Kochsalzlösung versetzte Dialysat des Schweinenierenautolysats. Die Hydrolyse der Ester bei neutraler Reaktion dauerte 2 Stunden. Ein bestimmtes Volumen jedes Hydrolysats wurde dann mit Kaninchen- oder Ziegenerythrozytensuspension gemischt, und die Zeit der beginnenden Hämolyse wurde beobachtet. Bei diesem Versuch bemerkte man bezüglich der Zeit der Hämolyse keinen Unterschied nach den Tierarten. Beide Arten Erythrozyten zeigten in Hydrolysaten des Dibrom- und Monobromthymylphosphats schon in 10 Minuten eine deutliche Lackfärbung. Nach einer Stunde wurde Hämolyse im Tetrabromnaphthylphosphat-Hydrolysat beobachtet und wieder in gleichem Grad bei Kaninchen- und Ziegenerythrozyten. Die Zellen

in den Hydrolysaten des Naphthyl- und Thymylphosphats blieben aber intakt. Man kann also die hämolytische Wirksamkeit der aromatischen Alkohole in absteigender Reihe so ordnen: Dibromthymol > Monobromthymol > Tetrabromnaphthol > Thymol, Naphthol.

Der Phosphatasegehalt ist wie erwähnt in Kaninchen weit grösser als in Ziegenerythrozyten. Die Erythrozytensuspension in den isotonischen Esterlösungen wurde darum bei Kaninchenzellen überhaupt schneller lackfarbig als bei Ziegen, und bei beiden Arten Erythrozyten immer um so schneller, je hämolytisch wirksamer die abzuspaltende Oxyverbindung ist.

Die kernhalogenierten aromatischen Oxyverbindungen wurden bisher ab und zu als Antiseptika untersucht. Wegen der Schwerlöslichkeit solcher Verbindungen in Wasser wurden sie in Alkalien gelöst und zu den bakteriellen Versuchen gebraucht. Durch Verestern mit Phosphorsäure können nun jene lipoidlöslichen Substanzen in wasserlöslicher Form verwendet werden. Die eiweissfällende und cytotoxische Wirkung soll an jener Stelle auftreten, wo die betreffenden Ester durch Phosphomonoesterase hydrolysiert werden. Die Phosphatasenversuche der vorliegenden Mitteilung dürften zur zukünftigen Verwendung solcher Ester als Antiseptica beitragen.

Experimenteller Teil.

I. DARSTELLUNG DER PHOSPHORSÄUREESTER.

A. β -Naphthyl-Phosphorsäure.

Nach der Vorschrift von Kunz (1894) wurde eine äquimolekulare Menge des β -Naphthols und Phosphoroxychlorids im Ölbad von 120° 20 Stunden erhitzt, bis die HCl-Entwicklung aufhörte. Bei Destillation unter vermindertem Druck (20 mm) ging Naphthylchloroxyphosphin bei 204–205° über. Das Destillat wurde mit Wasser umgerührt, wobei die anfänglich ölige Masse sich in Kristallbrei umwandelte, der in Äther aufgenommen, mit Natriumsulfat getrocknet und durch Zusatz von Petroleumäther als Kristalle gefällt wurde. Schmelzpunkt 167°.

Analyse: $C_{10}H_9O_4P$

berechnet: P 13.88%

gefunden: P 13.45%

B. β -Tetrabrom-Naphthylphosphorsäure.

11.2 g β -Naphthylphosphorsäure wurden in Rundkolben mit 5 g Eisessig und 2 g Pyridinchlorhydrat gemischt. Nach dem Aufsetzen des Steigrohrs tropfte man in die Mischung unter Schütteln 40 g Brom ein. Am Anfang musste die heftige Reaktion durch Kühlung mit Eiswasser gemässigt werden. Am nächsten Morgen wurde der Kolben auf Wasserbad erwärmt, um das überschüssige Brom zu entfernen. Die Reaktionsmasse erstarrte beim Abkühlen zu kristallinischem Brei und, zweimal aus Eisessig-Benzol-Gemisch umkristallisiert, erwies sich die Substanz als Tetrabromnaphthylphosphorsäure. Nadelförmige gelbe Kristalle. Schmelzpunkt 140° . Die Ausbeute war schlecht; 2 g.

Analyse: $Br_4C_{10}H_5O_4P$

berechnet: P 5.74%

gefunden: P 5.65%

C. Thymyl-Phosphorsäure.

Gleich wie Naphthylphosphorsäure wurde sie aus Thymol und Phosphoroxychlorid hergestellt. Die Säure wurde dann weiter wie folgt in Natriumsalz übergeführt: Man löste in Wasser die erhaltene Estersäure unter Neutralisation mit Natronlauge und dampfte die Lösung auf dem Wasserbad ein. Das getrocknete Natriumsalz wurde aus 95%igem Alkohol umkristallisiert. Nadel-förmige Kristalle mit 9 Molekülen Kristallwasser.

Analyse: $C_{10}H_{13}O_4PNa_2$

berechnet: P 11.32%

gefunden: P 11.57%

D. Mono-Brom-Thymyl-Phosphorsäure.

23 g Thymylphosphorsäure wurden in 10 ccm Eisessig gelöst und unter Steigrohr tropfenweise mit 16 g Brom versetzt. Am Anfang kühlte man den Kolben, erwärmte aber später, um die Bromierung zu beschleunigen. Die Reaktionsmasse wurde in ein grosses Volumen Wasser eingegossen, wobei die Monobromthymylphosphorsäure als ölige Masse ausscheid. Sie wurde in Äther

aufgenommen und mit Natronlauge neutralisiert. Die wässrige Lösung verdampfte man auf dem Wasserbad, und der Rückstand wurde aus 95%igem Alkohol umkristallisiert. Das Natrium-Monobromthymylphosphat bildete nadelförmige Kristalle und enthielt 5 Moleküle Kristallwasser.

Analyse: $\text{BrC}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_4\text{PNa}_2$ berechnet: P 8.78%
 gefunden: P 8.76%

E. Di-Brom-Thymyl-Phosphorsäure.

11.5 g Thymylphosphorsäure wurden in 460 g Chloroform gelöst und mit 16 g Brom in 30 g Chloroform versetzt. Nach 24 Stunden destillierte man das Chloroform unter vermindertem Druck ab, löste den Rückstand in Wasser unter Neutralisieren mit Natronlauge, dampfte die Lösung auf dem Wasserbad ein und kristallisierte den Rückstand aus 95%igem Alkohol um. Das Natrium Dibromthymylphosphat bildete nadelförmige Kristalle und enthielt 9 Moleküle Kristallwasser.

Analyse: $\text{Br}_2\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_4\text{PNa}_2$ berechnet: P 7.18%
 gefunden: P 7.34%

II. FERMENTLÖSUNG.

Die folgenden Organe bzw. Gewebe der Kaninchen wurden für die Versuche gebraucht: Niere, Lunge, Magenschleimhaut, Darm-schleimhaut und Blut. Sie wurden gut gemahlen und mit 10fachem Volumen Wasser 2 Tage bei 37° unter Toluol- und Chloroform-zusatz aufbewahrt. Die Autolysate wurden dann klar filtriert und in Kollodiumsäcken gegen destilliertes Wasser bis zur Phosphor-freiheit dialysiert. Das defibrinierte Blut wurde mit dem gleichen Volumen Wasser hämolytisiert und wie oben dialysiert.

III. VERSUCHSANORDNUNG.

Die Zusammensetzung der Versuchslösung war wie folgt:

M 100 Substratlösung	5 ccm
Puffer	10 „
Fermentlösung	10 „

Die freie Estersäure wurde vorher mit einer berechneten Menge Alkali neutralisiert und als Natriumsalzlösung gebraucht. Versuchstemperatur 37°. PH-Bestimmung elektrisch. Die gebrauchten Pufferlösungen waren Borax-Borsäuregemisch nach Palitzsch und Glykokoll-Natron. Phosphor-Bestimmung kolorimetrisch nach Briggs. Die endliche Konzentration der Substrate war $M/500$. Die in den folgenden Tabellen angegebenen Zahlen bedeuten die nachgewiesene Phosphormenge in mg für 2.5 ccm Versuchslösung berechnet. 100%ige Hydrolyse lieferte also 0.155 mg.

IV. ERGEBNISSE DER FERMENTVERSUCHE.

Um Raum zu ersparen, wird nur das Resultat mit Nierenphosphatase angegeben. Bei den sonstigen Fermenten werden nur die hydrolytischen Prozente bei den respektiven PH-Optima zusammengestellt, welche selbstverständlich bei jedem Ferment experimentell bestimmt wurden.

A. Nierenferment.

1. β -Naphthylphosphorsäure.

PH	6.75	7.74	8.37	9.19	9.85	10.62	11.54	12.18
1 Stde.	0.025	0.036	0.038	0.100	0.154	0.154	0.057	0
3 Stdn.	0.054	0.081	0.104	0.150	0.154	0.154	0.090	0

2. β -Tetrabromnaphthylphosphorsäure.

PH	6.75	7.74	8.37	9.19	9.85	10.62	11.54	12.18
1 Stde.	0.013	0.017	0.044	0.082	0.158	0.155	0.076	0
3 Stdn.	0.022	0.035	0.099	0.135	0.156	0.155	0.105	0

3. Thymylphosphorsäure.

PH	6.72	7.71	8.77	9.85	10.65	11.43	11.61
1 Stde.	0.061	0.092	0.155	0.155	0.155	0.066	0.009
3 Stdn.	0.132	0.155	0.155	0.155	0.155	0.086	0.011

4. Monobromthymylphosphorsäure.

PH	6.86	8.24	8.90	10.04	10.60	11.61	11.83
1 Stde.	0.054	0.095	0.150	0.155	0.156	0.097	0.030
3 Stdn.	0.129	0.150	0.155	0.156	0.156	0.123	0.040

5. Dibromthymylphosphorsäure.

PH	6.70	7.77	9.03	10.14	10.68	11.60	12.12
1 Stde.	0.056	0.086	0.155	0.155	0.155	0.051	0.009
3 Stdn.	0.130	0.150	0.158	0.155	0.155	0.065	0.009

B. Lungen- und Darmferment.

Organe Substrate	Lunge	Darmschleimhaut	Magenschleimhaut
Naphthylphosphat	PH Optimum 10.62 74% (1 Stde.)	PH Optimum 9.85 61% (1 Stde.)	PH 7-10 0
Tetrabromnaphthylphosphat	PH Optimum 10.62 93% (1 Stde.)	PH Optimum 9.83 74% (1 Stde.)	0
Thymylphosphat	PH Optimum 10.04 100% (1 Stde.)	PH Optimum 10.07 100% (1 Stde.)	0
Monobromthymylphosphat	PH Optimum 10.09 96% (1 Stde.)	PH Optimum 10.23 100% (1 Stde.)	0
Dibromthymylphosphat	PH Optimum 10.14 100% (1 Stde.)	PH Optimum 10.04 100% (1 Stde.)	0

C. Blutferment.

In Zusammenhang mit dem nachstehenden Hämolyseversuch wurde auch das PH-Optimum der Blutphosphatase ermittelt. Die Fermentlösung war das Dialysat des einfach defibrinierten Kaninchenblutes. Versuchsanordnung wie oben erwähnt. Unten wird nur das Resultat mit Monobromthymylphosphat angegeben.

PH	3.41	4.05	5.02	5.64	6.93	7.48	8.67	9.93
1 Stde.	0.064	0.064	0.073	0.059	0.068	0.062	0.044	0
3 Stdn.	0.117	0.114	0.147	0.127	0.133	0.113	0.088	0

PH 5 ist aber nur das scheinbare Optimum, wie es früher von Hori (1932) bei Glycerophosphathydrolyse diskutiert wurde. Man sieht aber, dass die Blutphosphatase bei neutraler Reaktion deutlich wirksam ist.

V. HÄMOLYSENVERSUCH.

Der Phosphomonoesterasengehalt wurde zuerst an Kaninchen- und Ziegenerythrozyten verglichen. Die Fermentlösung wurde wie folgt hergestellt: Die ausgewaschenen Erythrozyten wurden mit physiologischer Kochsalzlösung auf das anfängliche Blutvolumen verdünnt, mit gleichem Volumen Wasser hämolysiert und gegen destilliertes Wasser dialysiert, bis sie von Phosphor frei wurden. Die Zusammensetzung der Versuchslösungen war wie folgt:

<i>M</i> /100 Naphthylphosphat	5 ccm
Veronalpuffer	10 „
Wasser	5 „
Blutlösung	5 „

Die Versuchsanordnung war sonst wie oben erwähnt.

1. Kaninchen-Erythrozyten.

PH	5.17	6.12	7.08	7.90
2 Stdn.	0.0743	0.0625	0.0523	0.0228

2. Ziegen-Erythrozyten.

PH	5.25	6.05	7.12	8.20
2 Stdn.	0.0631	0.0533	0.0133	0

Die Kaninchenerythrozyten sind also weit reicher an Monoesterase als die der Ziegen. Ausserdem wurde bei Naphthyl- und

Thymylphosphat und ihren Derivaten die hydrolytische Wirksamkeit der Kaninchen- und Ziegenerythrozyten verglichen. Die Versuche wurden unter Berücksichtigung der nachstehenden Hämolyseversuche nur in neutraler Reaktion ausgeführt. Die isotonischen neutralisierten Esterlösungen wurden wie folgt hergestellt: 10 ccm $M/10$ Natriumsalzlösung wurden mit $M/10$ HCl gegen Lackmus neutralisiert, auf 50 ccm mit destilliertem Wasser verdünnt und dann mit 50 ccm 1.7%iger Kochsalzlösung gemischt. So erhielt man eine $M/100$ Esterlösung in 0.85% NaCl. 5 ccm ausgewaschener Erythrozytenbrei der Kaninchen resp. Ziegen wurden mit 50 ccm destilliertem Wasser hämolysiert und mit gleichem Volumen 1.7%iger Kochsalzlösung gemischt. 6 ccm dieser isotonischen Hämolyse wurden mit 10 ccm isotonischer neutralisierter Esterlösung gemischt und bei 37° 3 Stunden in ein Wasserbad gestellt. Die Zunahme des anorganischen Phosphors wurde wie üblich kolorimetrisch gemessen. Die für 2.5 ccm Versuchslösung berechneten mg-Zahlen werden unten tabellarisch angegeben.

Man sieht wieder den höheren Phosphatasegehalt der Kaninchenerythrozyten.

	Naphtthyl- phosphat	Tetrabrom- naphtthyl- phosphat	Thymyl- phosphat	Monobrom- thymyl- phosphat	Dibrom- thymyl- phosphat
Kaninchen- erythrozyten (3 Stdn.)	0.1229	0.1271	0.1034	0.111	0.1171
Ziegen- erythrozyten (3 Stdn.)	0.0153	0	0	0	0

Die Hauptversuche der fermentativen Hämolyse wurden wie folgt ausgeführt: Eine 10%ige Erythrozytensuspension wurde vorbereitet, und 3 ccm davon wurden mit der oben erwähnten isotonischen neutralisierten Esterlösung gemischt. Die Reagenzgläser wurden in den Brutschrank (37°) gestellt und die Zeit bis zur Lackfärbung wurde gemessen.

Zusammensetzung	Vollständige Lackfärbung
Dibromthymylphosphat + Kaninchenerythrozyten	nach 1 Stunde
Monobromthymylphosphat + „	nach 3 Stunden
Tetrabromnaphthylphosphat + „	nach 4 Stunden
Tetrabromnaphthylphosphat + Ziegenerythrozyten	nach 4 Stunden

Die sonstigen Kombinationen zeigten in 4 Stunden keine Lackfärbung. Die an Phosphatase reicheren Kaninchenerythrozyten lösten sich also früher als die Ziegenerythrozyten auf. Die gleiche Empfindlichkeit der Erythrozyten der Kaninchen und Ziegen gegen die halogenierten aromatischen Oxyverbindungen wurde weiter durch den folgenden Versuch bestätigt: Die dialysierte Nierenfermentlösung wurde mit dem gleichen Volumen 1.7%iger Kochsalzlösung gemischt. Sie war also isotonisch. 10 ccm dieser Lösung wurden mit 10 ccm isotonischer neutralisierter *M*/100 Esterlösung zusammen 2 Stunden bei 37° aufbewahrt. 5 ccm jeder Hydrolysenmischung wurden dann mit 3 ccm 10%iger Suspension von Kaninchen- oder Ziegenerythrozyten gemischt und in den Brutschrank (37°) gestellt. Bei Dibrom- und Monobromthymylphosphat wurde schon nach 10 Minuten eine deutliche Lackfärbung beobachtet. Bei Tetrabromnaphthylphosphat geschah das erst nach einer Stunde und bei Naphthyl- und Thymylphosphat sogar noch nicht nach 2 Stunden. Die verschiedenen Tierarten zeigten also keine Differenz.

LITERATUR.

- Asakawa, K. (1929): Journ. of Biochem., 11, 143.
 Hori, W. (1932): Journ. of Biochem., 16, 433.
 Kunz, Ph. (1894): Berichte d. deutsch. Chem. Ges., 27, 2564.

DIE BEDEUTUNG DER GALLENSÄURE IM KOHLEHYDRATSTOFFWECHSEL. XXVIII.

Glykocholie bei Zufuhr von Ergosterin und seinen Benzoat und das vegetative Nervensystem.

VON

TOSHIYUKI TANAKA.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut, Okayama.
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 4. April 1933.)

In meiner vorigen Mitteilung habe ich (1932) berichtet, dass die experimentelle, durch Zufuhr von Traubenzucker erzeugte Glykosurie durch Gallenverlust stark vermehrt, und dass diese Glykosurie sowie die experimentell durch Traubenzucker erzeugte Glykocholie durch Zufuhr von Cholsäure herabgesetzt wird. Die Glykocholie steht also mit der Gallensäurebildung der Leber in innigem Zusammenhang.

Durch die Untersuchung von Higashi (1930) wurde bewiesen, dass die Gallensäureausscheidung aus der Gallenfistel des Hundes durch Zufuhr von Ergosterin oder von mit ultravioletten Strahlen bestrahltem Ergosterin gesteigert, dagegen durch Zufuhr seines Benzoates nicht beeinflusst wird.

In diesem Sinne ist es interessant, den Einfluss des Ergosterins und seines Benzoates auf die Glykocholie zu erforschen. Neuerdings wurde von Itoo (1932) experimentell bewiesen, dass die Gallensäureausscheidung aus der Gallenfistel des Hundes durch die beiderseitige Splanchnikotomie herabgesetzt, dagegen durch die linksseitige allein vermehrt wird. Die Gallensäureausscheidung aus der Leber ist also mit der Funktion des vegetativen Nervensystems eng verknüpft, weshalb es auch von Bedeutung ist, den Einfluss der linksseitigen Splanchnikotomie auf die Glykocholie zu studieren.

In obengenanntem Sinne habe ich daher sowohl bei normalen als auch bei linkssplanchnikotomierten Hunden unter Zufuhr von Ergosterin oder seines Benzoates die Glykocholie und Gallensäureausscheidung parallel untersucht.

EXPERIMENTELLER TEIL.

1. Einfluss von Ergosterin und seinem Benzoat auf die Gallensäureausscheidung der linkssplanchnikotomierten, Gallenblasenfistel tragenden Hunde.

Die Gallenblasenfistel wurde in üblicher Weise nach Bickel angelegt; und nachdem sich der Hund von der Operationswunde der Gallenblasenfistel erholt hatte, wurde bei ihm die linksseitige Splanchnikotomie nach Schulze (1900) ausgeführt. Sofort nach der Operation wurde eine adäquate Menge von Adrenalin subcutan injiziert, um seinen Appetit zu fördern. Die Galle aus der Gallenblasenfistel wurde von 8 Uhr morgens bis 2 Uhr nachmittags in einer Glaskugel gesammelt. Die Gallensäure in der Galle wurde gasometrisch nach Foster u. Hooper (1919) bestimmt. Während des Versuches wurde eine bestimmte Menge Nahrung, Reis, trockne Fischchen, Shoyu und Gemüse, um 2 Uhr nachmittags verabreicht, und man liess den Hund seine eigene Galle aus der Gallenblasenfistel ruhig ablecken.

Die Versuche wurden in 3 Perioden, Vor-, Nach- und Versuchsperiode, geteilt. In der Versuchsperiode wurde an die Hunde 0,5 g Ergosterin oder 0,5 g Ergosterinbenzoat mit Brot 2, 10 und 18 Stunden vor der Sammlungszeit der Galle verfüttert und der Einfluss auf die Gallen- und Gallensäureausscheidung untersucht. Dieselbe Menge Brot wurde natürlich in allen Perioden verfüttert. Die Resultate sind in den folgenden Tabellen I–III zusammengestellt.

In der 6-stündigen Galle von splanchnikotomierten Hunden ist die Gallensäure durchschnittlich mit 623,51–1123,75 mg enthalten.

Aus den Tabellen I–III lässt sich ersehen, dass die Gallensäure in der 6-stündigen Galle sich bei Zufuhr des Ergosterins 18 Stunden

TABELLE I.
(18 St. nach Zufuhr)

linksplanchnikot. Hund A. (K. G. 13 kg. Operation 3/XII)					linksplanchnikot. Hund B. (K. G. 12,0 kg Operation 3/XII)				
Datum	Gallen- menge ccm	Spec. Gewicht	Tauro- cholsäure in 6 St. mg	Bemerk.	Datum	Gallen- menge ccm	Spec. Gewicht	Tauro- cholsäure in 6 St. mg	Bemerk.
8/1	44	1016	712,37	← Ergosterin 0,5 g	25/12	40	1018	653,62	← Ergosterin- benzoat 0,5 g
9/1	41	1016	590,09		26/12	42	1018	657,02	
10/1	39	1017	641,50		27/12	38	1020	590,09	
11/1	39	1018	671,61		28/12	43	1015	742,11	
12/1	43	1016	726,32		29/12	38	1017	630,85	
13/1	44,5	1016	714,20		30/12	31	1018	594,13	
14/1	46	1016	689,23		31/12	39	1016	621,67	
15/1	40	1016	611,02						
linksplanchnikot. Hund C. (K. G. 13 kg. Operation 17/1)					linksplanchnikot. Hund B. (K. G. 12,0 kg Operation 3/XII)				
Datum	Gallen- menge ccm	Spec. Gewicht	Tauro- cholsäure in 6 St. mg	Bemerk.	Datum	Gallen- menge ccm	Spec. Gewicht	Tauro- cholsäure in 6 St. mg	Bemerk.
26/1	44	1018	983,73	← Ergosterin 0,5 g	25/12	46	1021	812,61	← Ergosterin- benzoat 0,5 g
27/1	44	1017	793,15		26/12	40	1021	666,84	
28/1	45,5	1018	835,38		27/12	36	1021	699,15	
29/1	40	1018	741,74		28/12	40	1020	750,56	
30/1	45	1018	925,34		29/12	36	1021	662,43	
31/1	42,5	1018	945,91		30/12	28	1021	429,62	
1/2	37	1018	648,11		31/12	32	1020	630,85	
2/2	40	1018	730,00						

TABELLE II.
(10 St. nach Zufuhr)

linkssplanchnikot. Hund D. (K. G. 15 kg. Operation I/IV)						linkssplanchnikot. Hund D.				
Datum	Gallen- menge cem	Spec. Gewicht	Tauro- cholsäure in 6 St. mg	Bemerk.		Datum	Gallen- menge cem	Spec. Gewicht	Tauro- cholsäure in 6 St. mg	Bemerk.
11/4	53	1017	788,38			22/4	45	1020	778,46	
12/4	52	1018	865,12			23/4	41	1018	688,13	
13/4	41	1020	743,58			24/4	47	1017	854,47	
14/4	43	1018	890,46	← Ergosterin 0,5 g		25/4	46	1017	617,63	← Ergosterin- benzoat 0,5 g
15/4	44	1016	747,99			26/4	43	1020	761,21	
16/4	42	1017	606,25			27/4	43	1021	737,34	
linkssplanchnikot. Hund D.						linkssplanchnikot. Hund E. (K. G. 17 kg. Operation 15/IV)				
13/5	47	1018	679,69			3/5	46	1022	1195,97	
14/5	49	1018	635,26			4/5	54	1017	1009,43	
15/5	52	1016	643,33			5/5	50	1017	1165,86	
16/5	48	1016	740,08	← Ergosterin 0,5 g		6/5	41	1018	912,49	← Ergosterin- benzoat 0,5 g
17/5	47	1016	683,36			7/5	38	1020	916,89	
18/5	59	1015	697,68			8/5	30	1024	847,13	

TABELLE III.
(2 St. nach Zufuhr)

linksplanchnikot. Hund C.					linksplanchnikot. Hund E.				
Datum	Gallen- menge cem	Spec. Gewicht	Tauro- cholsäure in 6 St. mg.	Bemerk.	Datum	Gallen- menge cem	Spec. Gewicht	Tauro- cholsäure in 6 St. mg	Bemerk.
2/3	57	1018	757,53	← Ergosterin 0,5 g	21/2	42	1017	680,05	← Ergosterin- benzoat 0,5 g
3/3	35	1018	624,61		22/2	44	1017	820,69	
4/3	49	1018	753,86		23/2	40	1017	633,05	
5/3	40	1018	765,24		24/2	46	1018	800,49	
6/3	43	1018	847,86		25/2	33	1020	620,59	
7/3	27	1021	605,51		26/2	31	1020	633,05	
					27/2	33	1020	617,99	
linksplanchnikot. Hund D.					linksplanchnikot. Hund E.				
3/5	47	1017	712,74	← Ergosterin 0,5 g	13/5	33	1020	984,09	← Ergosterin- benzoat 0,5 g
4/5	47	1018	564,39		14/5	43	1020	1101,97	
5/5	50	1015	675,65		15/5	43	1020	1196,70	
6/5	53	1016	716,04		16/5	31	1025	1057,54	
7/5	43	1020	707,23		17/5	24,5	1028	785,44	
8/5	54	1015	650,31		18/5	32,5	1026	941,50	

vorher um 10,36–11,08%, bei Zufuhr 10 Stunden vorher um 11,44–13,90% und bei Zufuhr 2 Stunden vorher um 7,48–10,0% vermehrt.

Bei der 10–18 Stunden vorher erfolgten Zufuhr des Ergosterins wird in allen Fällen das ca. 0,1 g der Taurocholsäure in der 6-stündigen Galle vermehrt. Diese Vermehrung beträgt 0,4 g pro Tag. Die Taurocholsäure wird also pro Tag um 80% vom verfütterten Ergosterin gebildet, wenn die Gallensäure aus Ergosterin herkommen sollte. Die Vermehrung der Gallensäure in der Galle tritt stärker auf, wenn die Zufuhr des Ergosterins 10 Stunden vorher erfolgt, als wenn sie 18 Stunden vorher erfolgt.

Die Gallensäurebildung aus Ergosterin tritt also ca. 13 Stunden nach seiner Zufuhr am stärksten auf.

Doch tritt die Gallensäurebildung aus Ergosterin auch auf, wenn das Ergosterin 2 Stunden vorher zugeführt wird. Dies beruht höchstwahrscheinlich auf der durch die linksseitige Splanchnikotomie verursachten Übererregung des vagischen Nerven, wodurch die Gallensäurebildung in der Leber aus Ergosterin gefördert wird.

Die Gallensäure in 6-stündiger Galle wird durch Fütterung mit Ergosterinbenzoat nicht vermehrt, ganz gleich, ob es 18, 10 oder 2 Stunden vor der Gallensammlung verfüttert wird, wie Higashi (1930) es beim normalen Hunde beobachtet hat.

Aus dem Ergebnis geht hervor, dass die Gallensäureausscheidung auch bei dem linkssplanchnikotomierten Hunde durch die perorale Zufuhr des Ergosterins vermehrt wird, und dass diese Vermehrung 13 Stunden nach der Zufuhr am stärksten auftritt.

2. Einfluss des Ergosterins auf die Glykocholie bei normalem sowie linkssplanchnikotomiertem Hunde.

Bei diesem Versuch wurden zuerst dem eine permanente Gallenblasenfistel tragenden Hunde um 8 Uhr morgens 6 ccm (pro Kilo) einer 50%igen Glukoselösung intravenös injiziert, und von dieser Zeit bis 2 Uhr nachmittags wurde die Galle in einer Glas-
kugel gesammelt. Um 2 Uhr wurde eine bestimmte Nahrung verabreicht, und man liess den Hund seine eigene Galle ruhig ablecken. Von der gesammelten Galle wurde der Zucker- und Gallensäure-

gehalt in gleicher Weise wie zuvor bestimmt. Der Zuckergehalt wurde nach Hagedorn-Jensen bestimmt.

Dazwischen wurden 12 Stunden vor der Sammlung der Galle 0,5 g Ergosterin mit Brot verfüttert, und der Einfluss auf die Gallensäureausscheidung und die Glykocholie beobachtet. Diese Periode wurde als Versuchsperiode, und die Versuche vor und nach dieser Periode wurden als Vor- und Nachperiode bezeichnet. Der Zuckergehalt und die Gallensäuremenge der drei Perioden wurden miteinander verglichen.

Derselbe Hund wurde nach dem Versuch linksseitig splanch-
nikotomiert. Nachdem er sich von der Operationswunde erholt
hatte, wurde derselbe Versuch wie bei dem normalen Hunde aus-
geführt. Die Resultate sind in den folgenden Tabellen IV–VI
angegeben.

TABELLE IV.

Fistelhund (K. G. 13 kg Operation 26/V)						
Datum	Gallen- menge ccm	Spec. Gewicht.	Tauro- cholsäure in 6 St. mg	Zuckergehalt		Bemerk.
				mg	%	
25/6	62	1012	722,42	40,30	0,065	← Ergosterin 0,5 g " ←
26/6	57	1013	753,49	37,62	0,066	
27/6	65	1015	794,99	39,00	0,060	
28/6	53	1013	801,96	34,98	0,066	
29/6	65	1013	840,15	36,40	0,056	
30/6	66	1013	792,87	37,62	0,057	
1/7	52	1014	699,78	36,40	0,070	

linkssplanchnikot. Fistelhund (Operation 2/VII)

Datum	Gallen- menge cem	Spec. Gewicht.	Tau- cholsäure in 6 St. mg	Zuckergehalt		Bemerk.
				mg	%	
12/7	56	1013	779,20	30,24	0,054	← Ergosterin 0,5 g " ←
13/7	64	1014	897,80	32,00	0,050	
14/7	61	1013	956,56	34,77	0,057	
15/7	60	1013	1033,30	27,00	0,045	
16/7	70	1014	1138,69	23,80	0,034	
17/7	75	1012	949,89	33,75	0,045	
18/7	65	1014	957,29	32,50	0,050	

TABELLE V.

Fistelhund (K. G. 16 kg. Operation 14/VI)						
Datum	Gallen- menge ccm	Spec. Gewicht.	Tauro- cholsäure in 6 St. mg	Zuckergehalt		Bemerk.
				mg	%	
27/6	49	1016	669,41	49,00	0,100	
28/6	46	1016	672,34	44,16	0,096	
29/6	47	1018	716,41	47,94	0,102	
30/6	50	1018	752,76	44,00	0,088	← Ergosterin
1/7	51,5	1018	762,73	45,32	0,088	0,6 g
2/7	58	1015	836,26	52,20	0,090	← "
3/7	38	1020	704,57	46,36	0,122	

linkssplanchnikot. Fistelhund (Operation 5/VII)						
Datum	Gallen- menge ccm	Spec. Gewicht.	Tauro- cholsäure in 6 St. mg	Zuckergehalt		Bemerk.
				mg	%	
13/7	54	1016	832,81	46,44	0,086	
14/7	52	1018	830,61	57,32	0,091	
15/7	47	1017	764,51	40,42	0,086	
16/7	52	1015	924,24	39,52	0,076	← Ergosterin
17/5	56	1016	943,70	34,16	0,061	0,5 g
18/7	58	1016	928,65	45,24	0,078	← "
19/7	61	1017	918,37	52,46	0,086	

TABELLE VI.

Fistelhund (K. G. 14 kg. Operation I/IX)						
Datum	Gallen- menge ccm	Spec. Gewicht.	Tauro- cholsäure in 6 St. mg	Zuckergehalt		Bemerk
				mg	%	
10/9	38	1016	772,96	54,72	0,144	
11/9	34	1017	765,24	57,46	0,169	
12/9	33	1018	659,12	56,43	0,171	
13/9	29	1020	786,32	51,33	0,177	← Ergosterin
14/9	35	1019	837,95	48,30	0,138	0,5 g
15/9	29	1020	661,33	52,20	0,180	← "
16/9	33	1019	791,32	56,76	0,172	

linkssplanchnikot. Fistelhund (Operation 19/IX)

24/9	54	1015	842,72	53,46	0,099	
25/9	52	1016	815,18	49,40	0,095	
26/9	51	1016	790,09	49,47	0,097	
27/9	49	1018	920,50	37,24	0,076	← Ergosterin
28/9	45	1018	951,78	40,95	0,091	0,5 g
29/9	42	1018	720,08	45,78	0,109	← „
30/9	39	1018	750,56	52,26	0,134	
1/10	38	1019	779,93	49,78	0,131	

Aus den Tabellen IV–VI lässt sich ersehen, dass die Gallensäuremenge der normalen 6-stündigen Galle durchschnittlich 686,05–756,97 mg und die Zuckermenge 38,97–56,20 mg beträgt, während bei Zufuhr von Ergosterin am ersten Tage die Gallensäure um 5,94–9,74% vermehrt und der Zuckergehalt um 6,44–10,24% herabgesetzt wird. Am zweiten Tage wird die Gallensäureausscheidung um 10,99–14,41% vermehrt und die Glykocholie um 3,64–14,06% herabgesetzt.

Diese vermehrte Gallensäureausscheidung und herabgesetzte Glykocholie kehren allmählich wieder zum Anfangswert zurück.

Aus diesem Ergebnis lässt sich wohl der Schluss ziehen, dass durch Fütterung mit Ergosterin die Gallensäurebildung vermehrt wird, was unter gesteigerter Glykogenbildung in der Leber eine verminderte Glykocholie zur Folge hat. Es wurde schon von Chikamori (1932) histologisch bewiesen, dass die Glykogenbildung der Leber durch Fütterung mit Ergosterin vermehrt wird.

Die Gallensäuremenge der 6-stündigen Galle des linkssplanchnikotomierten Hundes beträgt durchschnittlich 809,31–877,85 mg. Die Gallensäureausscheidung aus der Gallenblasenfistel wird also durch die linksseitige Splanchnikotomie vermehrt, wie Itoo (1932) in seinem Versuch bewiesen hat.

Der Zuckergehalt der 6-stündigen Galle des linkssplanchnikotomierten Hundes beträgt durchschnittlich 32,33–50,78 mg. Dieses Ergebnis zeigt, dass der Zuckergehalt der Galle stärker vermindert ist als der der normalen Galle, was wohl auf der sich infolge der linksseitigen Splanchnikotomie vermehrenden, die

Glykogenbildung fördernden Gallensäure in der Leber beruhen dürfte.

Bei dem linkssplanchnikotomierten Hunde wird die Gallensäuremenge am ersten Tage durch die Zufuhr von Ergosterin um 12,81–17,71% vermehrt, der Zuckergehalt um 11,65–26,66% herabgesetzt, am zweiten Tage wird die Gallensäureausscheidung um 16,64–29,71% vermehrt, aber die Glykochole um 19,36–26,39% herabgesetzt, worauf beide wieder zum Anfangswert zurückkehren.

Die durch die Zufuhr von Ergosterin vermehrte Gallensäureausscheidung sowie die durch Ergosterin herabgesetzte Glykochole treten beim linkssplanchnikotomierten Hunde viel stärker auf als beim normalen Hunde.

Aus diesem Ergebnis geht hervor, dass die durch Verfütterung von Ergosterin vermehrte Gallensäureausscheidung durch die linksseitige Splanchnikotomie weiter gesteigert wird, was eine weitere Herabsetzung der durch die Zufuhr von Ergosterin herabgesetzten Glykochole zur Folge hat, wobei die Glykogenbildung der Leber durch die Vermehrung der Gallensäure weiter gefördert wird.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Gallensäureausscheidung aus der Gallenblasenfistel wird durch die linksseitige Splanchnikotomie vermehrt.

2. Diese durch die linksseitige Splanchnikotomie vermehrte Gallensäureausscheidung wird durch Fütterung mit Ergosterin weiter gesteigert, während sie durch Fütterung mit Ergosterinbenzoat gar nicht beeinflusst wird.

Die gesteigerte Gallensäureausscheidung tritt 2 Stunden nach der Zufuhr des Ergosterins ziemlich schwach, 10 Stunden nach der Zufuhr am stärksten und auch noch 18 Stunden nach der Zufuhr ziemlich stark auf.

3. Die durch Zuckerzufuhr erzeugte Glykochole des eine Gallenblasenfistel tragenden Hundes wird durch Fütterung mit Ergosterin herabgesetzt, wobei die Gallensäureausscheidung vermehrt wird.

4. Diese durch Zufuhr von Ergosterin herabgesetzte Glyko-

cholie und die durch jene vermehrte Gallensäureausscheidung werden durch die linksseitige Splanchnikotomie aufs neue gesteigert.

LITERATUR.

- Chikamori, S. (1932): Okayama Igakkai-Zasshi, **44**, Jg. 308.
 Foster, M. G. u. Hooper C. W. (1919): Jl. of Biolog. Chem., **38**, 355.
 Higashi, S. (1930): Arb. a. d. med. Univ. Okayama, **1**, 582.
 Itoo, T. (1932): Bioch. Zschr., **254**, 50.
 Schulze, O. (1900): Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmakol., **43**, 204.
 Tanaka, T. (1932): Jl. of Bioch., **15**, 381.
 Tanaka, T. (1932): Jl. of Bioch., **16**, 407.

ÜBER DEN EINFLUSS DER GALLENSÄURE AUF DEN CALCIUMSTOFFWECHSEL.

VII. Die Calcium- und Phosphorsäurebilanz der Hündin bei Zufuhr von Gallensäure.

VON

ISOKICHI OKII.

(Aus dem Biochemischen Institut zu Okayama
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 4. April 1933.)

In der vorigen Mitteilung (1932) habe ich berichtet, dass die Kalk- sowie die Phosphorsäureausscheidung im Kot des Hundes durch Zufuhr von Cholsäure herabgesetzt wird.

Nach Sekitoo (1929) und Kawada (1931) jedoch wird die Kalk- sowie die Phosphorsäureausscheidung im Harn und in der Galle durch eine solche Zufuhr vermehrt, wobei auch der Kalk- sowie Phosphorsäuregehalt des Blutes nach Sekitoo (1930), Andrew (1930) u. Kimura (1931) vermehrt wird. Die Verteilung des Kalkes und der Phosphorsäure in Organen und Geweben dürfte also durch die Zufuhr von Cholsäure beeinflusst werden. Es lässt sich wohl vermuten, dass die Gallensäure den Kalk- sowie Phosphorsäureansatz im Organismus, bzw. in wachsenden Knochen fördern kann, weil die Gallensäureausscheidung in der Galle des Hundes durch Zufuhr von Ergosterin, bzw. des Vitamins D, vermehrt wird, wie von Higashi (1930) schon bewiesen wurde. Bekanntlich fördert das Vitamin D aus Ergosterin den Ansatz des Kalkes sowie den der Phosphorsäure im Organismus.

Nach Uraki (1932) soll der Cholsäuremethylester durch Bestrahlung mit ultravioletten Strahlen zum Teil in seinen isomeren β -Cholsäuremethylester verwandelt werden. Es steht jedoch noch in Frage, ob er auch auf den Kalk- sowie Phosphoransatz im Organismus fördernd wirkt, wie dies beim bestrahlten Ergosterin der Fall war.

In obenerwähnten Sinne habe ich bei Hündinnen die Kalk- sowie Phosphorsäurebilanz unter Zufuhr einer bestimmten Nahrung mit Cholsäure oder mit dem bestrahlten Cholsäuremethylester untersucht.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Zum Versuch wurden kräftige, gut ernährte Hündinnen verwendet, bei welchen die Mündung der Harnröhre zwecks leichter Katheterisierung des Harns durch Operation unter dem Schnitt der hinteren Scheidewand entblösst wurde. Die Hündinnen liessen sich immer an die Kotentleerung ausserhalb des Käfigs gewöhnen, nachdem der Harn mittelst des Katheters ausgelassen worden war.

Die Versuche wurden in 3 Perioden, Vor-, Nach- und Versuchsperiode, geteilt. In der Versuchsperiode wurden 0,5 ccm einer 1%igen Na-Cholatlösung pro Kilo intravenös oder 1,5 ccm eines 0,5%igen bestrahlten Cholsäuremethylesters pro Kilo in Olivenöl gelöst subcutan verabreicht; dann wurde der Einfluss der Cholsäure und ihres Esters auf die Bilanz des Kalkes sowie auf die des Phosphors beobachtet.

Der Hündin von 8,1 kg Körpergewicht wurde täglich die gleiche Nahrung, 110 g (Tabelle I) oder 120 g (Tabelle II u. III) Reis, 30 g (Tabelle I) oder 40 g trockne Fischchen (Tabelle II u. III), 20 ccm Shoyu and 1500 ccm Wasser, verabreicht.

Der Kalkgehalt dieser Nahrung wurde nach der Veraschung auf trockenem Wege nach der Methode von De Waard (1919 u. 1924) und ihr Phosphorgehalt nach der Veraschung auf nassem Wege nach Neumann (1902 u. 1904) bestimmt. Es wurde erreicht, dass die Hündin täglich einmal mittels Katheters urinierte, und so ein Verlust des Harns vermieden wurde. Der Calcium- und Phosphorgehalt im Tagesharn wurde nach Veraschung auf nassem Weg nach derselben Methode wie zuvor bestimmt.

Die Abgrenzung des Kotes mit Karmin ist in der Weise geschehen, dass 0,3 g Karmin einen Tag um den anderen mit der Nahrung verfüttert wurde. Die Untersuchung des täglichen Kotes erfolgte in der von Fuziwara (1931) angegebenen Weise, sein Calcium- und Phosphorgehalt pro Tag wurde in genau der gleichen

Weise wie zuvor bestimmt. Die Resultate sind in den folgenden Tabellen I–VI AB. zusammengestellt.

1. *Versuch bei intravenöser Zufuhr der Cholsäure.*

120 g Reis haben 72 mg Kalk u. 147,5 mg Phosphor enthalten, 40 g trockne Fischchen 640 mg Kalk u. 620 mg Phosphor und 20 cem Shoyu 10 mg Kalk u. 0,5 mg Phosphor. Der Kalkgehalt der täglich aufgenommenen Nahrung bei Hund A betrug 722 mg, der Phosphorgehalt derselben 768 mg. Die Hündin B hat täglich 688,5 mg Kalk und 755,3 mg Phosphor aufgenommen.

Aus den Tabellen I–III AB lässt sich ersehen, dass von dem aufgenommenen Kalk in der Vorperiode, mit einer Ausnahme, pro Tag durchschnittlich 1,60–3,12%, und in der Nachperiode 0,39–2,19%, mit einer Ausnahme, aus dem Körper verloren gehen, während in der Versuchsperiode gerade umgekehrt durchschnittlich 6,81–22,7% im Körper deponiert werden. Der Kalk in der Nahrung wird also bei der Hündin durch Zufuhr von Cholsäure im Körper angesetzt, wobei die Kalkbilanz sich im allgemeinen positiv zeigt. Was die Phosphorbilanz betrifft, so wird aus den Tabellen I–III AB ersichtlich, dass von dem Phosphor der Nahrung in der Vorperiode, mit einer Ausnahme, pro Tag durchschnittlich 1,56–1,84%, und in der Nachperiode 0,13–4,09%, ohne Ausnahme, aus dem Körper verloren gehen, während von dem Phosphor in der Versuchsperiode, ohne Ausnahme, 6,87–9,42% im Körper behalten werden. Der als Nahrung aufgenommene Phosphor wird also unter positiver Bilanz im Körper angesetzt. Die Cholsäure fördert also bei der Hündin den Ansatz des Kalkes und des Phosphors im Körper.

2. *Versuch bei subcutaner Zufuhr des bestrahlten
Cholsäuremethylesters.*

Auch diesmal wurde der Kalk- sowie Phosphorgehalt der täglich aufzunehmenden Nahrung analysiert und gefunden, dass 150 g Reis 45 mg Kalk u. 93 mg Phosphor, 40 g trockne Fischchen 752 mg Kalk u. 728 mg Phosphor enthalten. Dazu wurden 3 g Kochsalz und 1000 cem destilliertes Wasser als Nahrung verabreicht.

TABELLE I A.

Datum 1932	Harn- menge ccm	Spec. Gew.	Kot- menge g	Ca pro Tag						Bemerk.	
				Harn		Kot		gesamt. Ausgabe	gesamt. Eingabe		Bilanz
				mg	mg %	mg	%				
16/VI	400	1032	38	19.2	4.8	795.0	2.09	814.2	722.0	-92.2	
17/ "	375	1026	46	25.9	6.9	730.8	1.59	756.7	"	-34.7	
18/ "	421	1024	34	25.3	6.0	637.0	1.87	662.3	"	+59.7	
19/ "	370	1026	39	16.7	4.5	734.4	1.88	751.1	"	-29.1	
20/ "	355	1030	35	24.9	7.0	607.2	1.73	632.1	"	+89.9	0.5 ccm 1% Na-cholatlös. pro Kilo
21/ "	360	1032	33	36.0	10.0	677.6	2.05	713.6	"	+8.4	
22/ "	350	1032	31	15.4	4.4	667.4	2.15	682.8	"	+39.2	
23/ "	380	1030	35	20.9	5.5	673.2	1.92	694.1	"	+27.9	
24/ "	340	1032	39	19.7	5.8	798.0	2.05	817.7	"	-95.7	
25/ "	360	1032	33	29.0	8.0	635.2	1.92	664.2	"	+57.8	

TABELLE I B.

Datum 1932	Harn- menge mg	Spec. Gew.	Kot- menge	P pro Tag						Bemerk.	
				Harn		Kot		gesamt. Ausgabe	gesamt. Eingabe		Bilanz
				mg	mg %	mg	%				
16/IV	400	1032	38	152.9	38.2	684.2	1.80	837.1	768.0	-69.1	0.5 cem 1% Na-cholatlos. pro Kilo
17/ "	375	1026	46	104.1	29.4	659.7	1.43	763.8	"	+4.2	
18/ "	421	1024	34	133.0	31.6	599.8	1.77	732.8	"	+35.2	
19/ "	370	1026	39	114.8	31.0	699.8	1.79	814.6	"	-46.6	
20/ "	355	1030	35	145.6	41.0	543.4	1.55	689.0	"	+79.0	
21/ "	360	1032	33	145.6	40.4	556.6	1.69	702.2	"	+65.8	
22/ "	350	1032	31	137.7	39.3	586.1	1.89	723.8	"	+44.2	
23/ "	380	1030	35	124.2	32.7	649.7	1.86	773.9	"	-5.9	
24/ "	340	1032	39	116.8	34.4	758.5	1.94	874.3	"	-106.3	
25/ "	360	1032	33	139.6	38.8	651.2	1.97	790.8	"	-22.8	

0.5 cem 1%
Na-cholatlos.
pro Kilo

TABELLE II A.

Datum 1932	Harn- menge ccm	Spec. Gew.	Kot- menge g	Ca pro Tag						Bemerk.	
				Harn		Kot		gesamt. Ausgabe	gesamt. Eingabe		Bilanz
				mg	mg %	mg	%				
12/V	350	1026	26	25.2	7.2	598.6	2.30	623.8	656.0	+ 32.2	
13/ "	340	1024	32	15.3	4.5	723.8	2.26	739.1	"	- 83.1	
14/ "	260	1026	37	17.7	6.8	665.6	1.80	683.3	"	- 27.3	
15/ "	280	1030	29	16.8	6.0	603.0	2.08	619.8	"	+ 36.2	
16/ "	300	1032	27	19.8	6.6	546.0	20.2	565.8	"	+ 90.2	0.5 cem 1% Na-cholatlös. pro Kilo
17/ "	300	1032	31	17.1	5.7	579.6	1.87	596.7	"	+ 59.3	
18/ "	320	1030	34	15.4	4.8	637.0	1.87	652.4	"	+ 3.6	
19/ "	270	1032	33	12.2	4.5	672.0	2.04	684.2	"	- 28.2	
20/ "	330	1032	32	20.3	5.8	667.4	2.09	687.7	"	- 31.7	
22/ "	320	1032	31	22.4	7.0	634.8	2.05	657.2	"	- 1.2	

TABELLE II B.

Datum 1932	Harn- menge cem	Spec. Gew.	Kot- menge g	P pro Tag						Bemerk.	
				Harn		Kot		gesamt. Ausgabe	gesamt. Eingabe		Bilanz
				mg	mg %	mg	%				
12/V	350	1026	26	139.6	39.9	513.3	1.97	652.9	704.3	+51.4	
13/ "	340	1024	32	148.9	43.8	648.6	2.03	797.5	"	-93.2	
14/ "	260	1026	37	144.0	55.4	602.2	1.63	746.2	"	-41.9	
15/ "	280	1030	29	108.6	38.8	555.8	1.92	664.4	"	+39.9	
16/ "	300	1032	27	98.1	32.7	504.8	1.87	602.9	"	+101.4	0.5 cem 1% Na-cholatiö. pro Kilo
17/ "	300	1032	31	138.0	46.0	570.9	1.84	708.9	"	-4.6	
18/ "	320	1030	34	83.9	23.3	667.9	1.97	751.8	"	-47.5	
19/ "	270	1032	33	133.8	63.7	566.4	1.72	700.2	"	+4.1	
20/ "	330	1032	32	141.6	39.9	647.8	2.03	789.4	"	-85.1	
21/ "	320	1032	31	92.0	28.3	598.9	1.93	690.9	"	+13.4	

TABELLE III A.

Datum 1932	Harn- menge ccm	Spec. Gew.	Kot- menge g	Ca pro Tag						Bemerk.	
				Harn		Kot		gesamt. Ausgabe	gesamt. Eingabe		Bilanz
				mg	mg %	mg	%				
1/VI	300	1030	32	25.2	8.4	676.8	2.12	702.0	688.5	-13.5	0.5 ccm 1% Na-cholatlös. pro Kilo
2/ "	250	1026	42	17.2	6.9	729.6	1.74	746.9	"	-58.4	
3/ "	220	1026	27	14.3	6.5	639.4	2.37	653.7	"	+34.8	
4/ "	300	1034	28	23.4	7.8	604.8	2.16	628.2	"	+60.3	
5/ "	300	1030	33	24.9	8.3	742.0	2.25	766.9	"	-78.4	
6/ "	350	1032	23	32.6	9.3	448.4	1.95	481.0	"	+207.5	
7/ "	330	1030	25	29.7	9.0	657.0	2.63	686.7	"	-1.8	
8/ "	370	1030	32	25.2	6.8	707.2	2.21	732.4	"	-43.9	
9/ "	310	1030	27	25.1	8.1	582.8	2.16	607.9	"	+80.6	
10/ "	430	1026	31	24.9	5.8	714.0	2.30	738.9	"	-50.4	

TABELLE III B.

Datum 1932	Harn- menge ccm	Spec. Gew.	Kot- menge g	P pro Tag						Bemerk.	
				Harn		Kot		gesamt. Ausgabe	gesamt. Eingabe		Bilanz
				mg	mg %	mg	%				
1/VI	300	1030	32	149.7	49.9	619.9	1.94	769.6	755.3	-14.3	
2/ "	250	1026	42	120.5	48.2	726.2	1.73	846.7	"	-91.4	
3/ "	220	1026	27	136.0	61.8	575.3	2.13	711.3	"	+44.0	
4/ "	300	1034	28	154.5	51.4	489.1	1.75	643.6	"	+111.7	
5/ "	300	1030	33	181.2	60.4	660.9	2.00	842.1	"	-86.8	0.5 cem 1% Na-cholatlös. pro Kilo
6/ "	350	1032	23	157.2	44.9	389.5	1.69	546.7	"	+208.6	
7/ "	330	1030	25	129.7	39.3	608.4	2.43	738.1	"	+17.2	
8/ "	370	1030	32	190.6	51.5	633.9	1.98	824.5	"	-69.2	
9/ "	310	1030	27	144.2	64.5	518.4	1.92	662.6	"	+92.7	
10/ "	430	1026	31	150.1	34.9	649.7	2.10	799.8	"	-44.5	

Die täglich aufgenommene Gesamtmenge an Kalk betrug 797 mg, die an Phosphor 821 mg.

Aus den Tabellen IV–VI ist ersichtlich, dass von dem als Nahrung aufgenommenen Kalk in der Vorperiode nur bei einem Fall pro Tag durchschnittlich 0,19% und in der Nachperiode mit einer Ausnahme 6,68–15,64% aus dem Körper ausgeschieden wurden, während in der Versuchsperiode 7,37–12,03% im Körper zurückgehalten wurden. Die Kalkbilanz der Hündin wird also durch die Zufuhr des bestrahlten Cholsäuremethylesters positiv, wobei ein Kalkansatz im Körper stattfindet.

Von dem täglich aufgenommenen Phosphor gehen in der Vorperiode nur bei einem Fall durchschnittlich 0,09% und in der Nachperiode 1,41–11,81% aus dem Körper verloren, während in der Versuchsperiode 7,44–15,98% im Körper deponiert werden.

Der als Nahrung aufgenommene Phosphor wird also durch die Wirkung des bestrahlten Cholsäuremethylesters unter positiver Bilanz im Körper angesetzt, genau wie es beim Kalk der Fall ist.

Aus den obigen Daten geht hervor, dass die den Kalk der Nahrung im Körper deponierende Wirkung des mit ultravioletten Strahlen bestrahlten Cholsäuremethylesters viel stärker auftritt als die der Cholsäure, während sich die den Phosphor deponierende Wirkung bei der Cholsäure viel stärker zeigt als bei dem Cholsäuremethylester. Die den Kalkansatz fördernde Wirkung der Cholsäure wird also durch Bestrahlung mit ultravioletten Strahlen verstärkt.

ZUSAMMENFASSUNG.

Kalk und Phosphor, als Nahrung aufgenommen, werden sowohl durch intravenöse Zufuhr von Cholsäure als auch durch subcutane Zufuhr des mit ultravioletten Strahlen bestrahlten Cholsäuremethylesters unter positiver Gestaltung ihrer Bilanz im Körper angesetzt.

TABELLE IV A.

Datum 1932	Harn- menge ccm	Spec. Gew.	Kot- menge g	Ca pro Tag						Bemerk.	
				Harn		Kot		gesamt. Ausgabe	gesamt. Eingabe		Bilanz
				mg	mg %	mg	%				
12/IX	300	1022	29	19.5	6.5	656.6	2.26	676.1	797.0	+120.9	1.5 cem 0.5% bestr. Ester pro Kilo
13/ "	510	1019	43	24.5	4.8	882.0	2.05	906.5	"	-109.5	
14/ "	460	1022	27	23.0	5.0	893.0	3.31	916.0	"	-119.0	
15/ "	390	1030	32	19.5	5.0	665.6	2.68	685.1	"	+111.9	
16/ "	340	1030	32	17.3	5.1	712.8	2.23	730.1	"	+66.0	
17/ "	450	1028	24	18.5	4.1	668.8	2.79	687.3	"	+109.7	
18/ "	350	1030	41	17.2	4.9	1000.4	2.44	1017.6	"	-220.6	
19/ "	490	1020	35	20.6	4.2	890.0	2.51	900.6	"	-103.6	
20/ "	410	1030	37	16.8	4.1	946.2	2.56	963.0	"	-166.0	
21/ "	400	1028	32	16.0	4.0	789.6	2.47	805.6	"	-8.6	

1.5 ccm 0.5%
bestr. Ester
pro Kilo

TABELLE IV B.

Datum 1932	Harn- menge ccm	Spec. Gew.	Kot- menge g	P pro Tag						Bemerk.	
				Harn		Kot		gesamt. Ausgabe	gesamt. Eingabe		Bilanz
				mg	mg %	mg	%				
12/IX	300	1022	29	43.2	14.4	482.7	1.66	525.9	821.0	+ 295.1	
13/ "	510	1019	43	113.2	22.2	698.0	1.62	811.2	"	+ 9.8	
14/ "	460	1022	27	145.3	31.6	817.8	3.03	963.1	"	- 142.1	
15/ "	390	1030	32	138.5	35.5	579.3	1.81	717.8	"	+ 103.2	
16/ "	340	1030	32	100.0	29.4	582.9	1.82	682.9	"	+ 138.1	1.5 ccm 0.5% bestr. Ester
17/ "	450	1028	24	109.8	24.4	587.1	2.44	696.9	"	- 124.1	pro Kilo
18/ "	350	1030	41	162.8	46.5	878.4	2.14	1041.2	"	- 220.2	
19/ "	490	1020	35	144.1	29.4	700.7	2.00	844.8	"	- 23.8	
20/ "	410	1030	37	161.1	39.3	783.2	2.12	944.3	"	- 123.3	
21/ "	400	1028	32	199.6	49.9	642.2	2.01	841.8	"	- 20.8	

TABELLE V A.

Datum	Harn- menge cem	Spec. Gew.	Kot- menge g	Ca pro Tag						Bemerk.	
				Harn		Kot		gesamt. Ausgabe	gesamt. Eingabe		Bilanz
				mg	mg %	mg	%				
25/IX	540	1024	55	28.6	5.3	768.0	1.40	796.6	1042.0	+245.4	
26/ "	620	1022	78	32.2	5.2	1112.4	1.43	1144.6	"	-102.6	
27/ "	600	1022	67	37.8	6.3	1104.0	1.65	1141.8	"	-99.8	
28/ "	730	1018	65	48.9	6.7	1044.0	1.60	1092.9	"	-50.9	
29/ "	580	1022	58	27.3	4.7	896.4	1.55	923.7	"	+118.3	1.5 cem 0.5% bestr. Ester
30/ "	630	1022	87	36.1	5.8	873.6	1.00	909.7	"	+132.3	pro Kilo
1/X	705	1022	56	36.5	5.2	1012.5	1.81	1049.0	"	-7.0	
2/ "	720	1020	51	23.0	3.2	972.8	1.91	995.8	"	+46.2	
3/ "	650	1024	55	21.5	3.3	992.0	1.80	1013.5	"	+28.5	
4/ "	715	1024	53	30.0	4.2	1060.9	2.00	1090.9	"	-48.9	

TABELLE V B.

Datum 1932	Harn- menge ccm	Spec. Gew.	Kot- menge g	P pro Tag						Bemerk.	
				Harn		Kot		gesamt. Ausgabe	gesamt. Eingabe		Bilanz
				mg	mg %	mg	%				
25/IX	540	1024	55	388.8	72.0	682.4	1.24	1071.2	1158.0	+ 86.8	
26/ "	620	1022	78	394.9	63.7	759.1	0.97	1154.0	"	+ 4.0	
27/ "	600	1022	67	422.4	70.4	790.3	1.18	1212.7	"	- 54.7	
28/ "	730	1018	65	400.8	54.9	797.4	1.23	1198.2	"	- 40.2	
29/ "	580	1022	58	305.1	52.6	708.0	1.22	1013.1	"	+ 144.9	1.5 ccm 0.5% bestr. Fster pro Kilo
30/ "	630	1022	87	453.6	72.0	676.5	0.78	1130.1	"	+ 27.9	
1/X	705	1022	56	324.3	46.0	780.8	1.39	1105.1	"	+ 52.9	
2/ "	720	1020	51	391.0	54.3	763.8	1.52	1154.8	"	+ 3.2	
3/ "	650	1024	55	432.3	66.5	766.4	1.39	1198.7	"	- 40.7	
4/ "	715	1024	53	456.2	63.8	790.9	1.49	1247.1	"	- 89.1	

TABELLE VI A.

Datum 1932	Harn- menge ccm	Spec. Gew.	Kot- menge g	Ca pro Tag								Bemerk.
				Harn		Kot		gesamt. Ausgabe	gesamt. Eingabe	Bilanz		
				mg	mg %	mg	%					
19/X	780	1026	60	32.8	4.2	952.0	1.59	984.8	1042.0	+57.2		
20/ "	915	1020	57	31.1	3.4	934.8	1.64	965.9	"	+76.1		
21/ "	880	1020	54	37.7	4.4	932.2	1.73	969.9	"	+72.1		
22/ "	820	1020	64	36.9	4.5	979.0	1.53	1015.9	"	+26.1		
23/ "	710	1022	52	32.0	4.5	908.6	1.75	940.6	"	+101.4	1.5 ccm 0.5% bestr. Ester pro Kilo	
24/ "	630	1024	65	35.9	5.7	954.0	1.47	989.9	"	+52.1		
25/ "	750	1022	71	38.3	5.1	1036.8	1.46	1075.1	"	-33.1		
26/ "	670	1022	72	38.9	5.8	989.4	1.37	1028.3	"	+13.7		
27/ "	820	1022	65	45.1	5.5	1080.0	1.66	1125.3	"	-83.1		
28/ "	670	1022	71	36.9	5.5	1180.8	1.66	1217.7	"	-175.7		

TABELLE VI B.

Datum 1932	Harn- menge cem	Spec. Gew.	Kot- menge g	P pro Tag						Bemerk.	
				Harn		Kot		gesamt. Ausgabe	gesamt. Eingabe		Bilanz
				mg	mg %	mg	%				
19/X	780	1026	60	522.6	67.0	712.3	1.19	1234.9	1158.0	-76.9	
20/ "	915	1020	57	466.6	51.0	740.5	1.30	1207.1	"	-49.1	
21/ "	880	1020	54	366.1	41.6	699.9	1.30	1066.0	"	+92.0	
22/ "	820	1020	64	341.0	41.6	754.7	1.18	1095.7	"	+62.3	
23/ "	710	1022	52	362.1	51.0	631.4	1.22	993.5	"	+164.5	1.5 cem 0.5% bestr. Ester
24/ "	630	1024	65	321.3	51.0	743.4	1.14	1064.7	"	+93.3	pro Kilo
25/ "	750	1022	71	440.3	58.7	770.9	1.09	1211.2	"	-53.2	
26/ "	670	1022	72	334.3	49.9	763.4	1.06	1097.7	"	+60.3	
27/ "	820	1022	65	413.3	40.4	747.9	1.15	1161.2	"	-3.2	
28/ "	670	1022	71	363.8	54.3	856.3	1.21	1220.1	"	-62.1	

REFERENCES.

- Andrew, E. Rewbridge, A. G. u. Hirdina, L. S. (1930): *Proc. Soc. exp. Biol. u. Med.*, **27**, 755.
- De Waard, D. T. (1919 u. 1923): *Bioch. Zschr.*, **97**, 176., u. **135**, 581.
- Fuziwara, K. (1931): *Jl. of Bioch.*, **13**, 465.
- Higashi, S. (1930): *Arb. a. d. med. Univ. Okayama*, **1**, 582.
- Kawada, Y. (1931): *Jl. of Bioch.*, **13**, 133.
- Kimura, T. (1931): *Jl. of Bioch.*, **14**, 51.
- Neumann, A. (1902 u. 1904): *Zschr. physiol. Chem.*, **37**, 115., u. **43**, 32.
- Okii, I. (1932): *Jl. of Bioch.*, **16**, 217.
- Sekitoo, T. (1929): *Jl. of Bioch.*, **11**, 251.
- Sekitoo, T. (1930): *Jl. of Bioch.*, **11**, 391.
- Uraki, Z. (1932): *Zschr. für physiol. Chem.*, **207**, 16.

EINFLUSS DER GALLENSÄURE AUF DIE ENZYMATISCHE SPALTUNG VON LECITHIN.

VON

HIROSHI TAKATA.

*(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Okayama,
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)*

(Eingegangen am 4. April 1933.)

Seit Bokay (1887) wurde die enzymatische Spaltung von Lecithin von vielen Autoren, wie Meyer (1906), Schmoff-Simanowski und Sieber (1906), und Wohlgemuth (1912) untersucht. Das lecithinspaltende Ferment wurde bereits von vielen Autoren in verschiedenen Organen gefunden, und zwar von Waldvogel (1904) in der Leber, von Simon (1911) im Gehirn, von Kutscher u. Lohmann (1903) in der Pankreas, von Thiele (1913) u. Porter (1917) in verschiedenen Organen und von Akamatsu (1923) in der Takadiastase.

Die Frage des biologischen Ab- und Aufbaues des Lecithins im Organismus wird eifrig diskutiert, und es ist bis vor kurzem unentschieden gewesen, ob sich der Abbau durch ein spezifisches Ferment Lecithinase oder durch Lipase oder Phosphatase vollzieht.

Durch die eingehenden Untersuchungen von Robison (1923), Robison u. Soames (1924 u. 1925), Martrand u. Robison (1926 u. 1927), Kay (1926, 1928 u. 1930) und Neuberg (1918, 1926 u. 1928) über Phosphatase entwickelten sich die Studien über die Wirkung der Lecithinase, welche Phosphat aus Lecithin befreit.

Nach Kay (1926) King, King u. Page (1930) und King (1931) befindet sich die spezifische Lecithinase, welche Phosphat aus Lecithin langsam abspaltet, und deren Eigenschaften von denjenigen der Phosphatase verschieden sind, in verschiedenen Organen.

Dem haben sich Viale u. Combes (1927), Bianco (1929), und Portis (1929) angeschlossen.

Ich habe schon berichtet (1931), dass die Wirkung der

Glycerophosphatase der Leber u. der Niere durch die Cholsäure gehemmt wird, während nach Shoda (1926) Kaziro u. Tsuji (1930) die Lipasewirkung dadurch gefördert wird. Andreseits steht fest, dass die Nucleinsäurespaltung im Organismus durch Gallensäure gefördert wird, wie Karasawa (1926 u. 1927) Hatakeyama (1927), Okamura (1928), Fuziwara (1931) und Sekitoo (1929) nachgewiesen haben.

Die Gallensäure wirkt also auf das die organische Phosphorsäureverbindung spaltende Ferment entweder fördernd oder hemmend. In diesem Sinne ist es von Bedeutung, die Spaltung des Lecithins in den Organen bei Gegenwart von Gallensäure zu erforschen.

EXPERIMENTELLER TEIL.

1. *Chloroformwassereextrakt der Organe als Fermentlösung.*

Die schnell herausgeholte Leber und Niere von Kaninchen wurden in einem Porzellanmörser gründlich zu Brei verrieben. Dieser Brei wurde unter Zusatz einer fünffachen Gewichtsmenge von Chloroformwasser 48 Stunden lang bei Zimmertemperatur stehen gelassen und nach der Methode von King (1931) durch Watte langsam abfiltriert. Dieses getrübbte Filtrat wurde im Mengenverhältnisse der Tabelle I zum Versuch benutzt (siehe Tab. I). Der Versuch wurde nach King im Medium von $\text{pH} = 7,5$ unter Pufferung mit Borax und Borsäure (nach Palitzsch) ausgeführt. Als Substrat wurde das Eigelblecithin von E. Merck unter einmaliger Reinigung nach Levene u. Rolf (1927) zum Versuch verwendet. Zur Herstellung einer 1%igen Emulsion von Lecithin wurde eine 5%ige alkoholische Lösung von Lecithin in das vierfache Volumen von siedendem Wasser gegossen. Der grösste Teil des Alkohols wurde dabei verdampft. Dann wurde durch Zusatz von Wasser das ursprüngliche Volumen wiederhergestellt.

Die fermentative Hydrolyse wurde im Brutschrank bei 37°C ausgeführt. Nach 5 Tagen wurde die Versuchslösung mittelst einer 5%igen Trichloressigsäurelösung enteiweisst und die Phosphorsäure

in genau der gleichen Weise bestimmt, wie in der früheren Mitteilung (1931) angegeben ist.

Die Resultate sind in den Tabellen II u. III angegeben. Bei Versuchen konnte im Lecithin keine Spur von anorganischem Phosphat nachgewiesen werden.

TABELLE I.
Versuchsanordnungen.

	A	B	C	D	E
1% Lecithinemulsion (ccm)	25	25	25	25	0
Fermentlösung (ccm)	30	30	30	30	30
Pufferlösung (ccm)	20	20	20	20	20
0,4% Natr. Cholatlösung (ccm)	0	1	2	5	0
Wasser (ccm)	5	4	3	0	30
Toluol (ccm)	2	2	2	2	2

a) Versuch mit Niere.

Aus der Tabelle II ist ersichtlich, dass die anorganische Phosphorsäure in der Nieren-Versuchslösung bei Zufuhr von Cholsäure im allgemeinen zugenommen hat, obwohl diese Zunahme je nach dem Gehalt an Cholsäure ganz verschieden ist. Bei 5 mg%igem Cholsäuregehalt wird die Phosphorsäurespaltung im Vergleich zu der der Kontrolle durchschnittlich um 1,40%, bei 10 mg%igem Gehalt um 6,16% und bei 25 mg%igem Gehalt um 5,69% erhöht. Somit wird die Phosphorsäurespaltung beim Versuch mit Niere durch Zusatz von Cholsäure im allgemeinen vermehrt.

b) Versuch mit Leber.

Die Befreiung der Phosphorsäure in der Leber-Versuchslösung wird im Vergleiche zu der der Kontrolle bei 5 mg%igem u. 10 mg%igem Cholsäuregehalt durchschnittlich um 2,68% und bei 25 mg%igem um 1,34% gesteigert, wie in der Tabelle III angegeben ist. Aus dem Ergebnis geht hervor, dass die Phosphorsäurespaltung bei Versuchen mit Leber wie mit Niere von der zugesetzten Menge von Cholsäure abhängig ist, und dass sie bei Gegenwart von grösseren Mengen von Cholsäure sogar gehemmt wird.

TABELLE II.
Versuch mit Niere.

Nr. d. Versuche	A		B		C		D		E
	ermitt. P. mg	abgespalt. P. (A-E) mg	ermitt. P. mg	abgespalt. P. (B-E) mg	ermitt. P. mg	abgespalt. P. (C-E) mg	ermitt. P. mg	abgespalt. P. (D-E) mg	
1	9,74	2,56	9,77	2,59	9,81	2,63	9,81	2,63	7,18
2	10,04	2,33	9,91	2,20	10,10	2,39	10,17	2,46	7,71
3	9,44	1,80	9,57	1,93	9,77	2,13	9,64	2,00	7,64
4	8,86	1,64	8,95	1,73	9,00	1,78	9,09	1,87	7,22
5	8,64	1,81	8,73	1,90	8,95	2,12	8,95	2,12	6,83
6	9,81	2,57	9,76	2,52	9,74	2,50	9,67	2,43	7,24
7	9,71	2,06	9,77	2,12	9,79	2,14	9,79	2,14	7,65
Durchschnitts- wert.		2,11		2,14		2,24		2,23	
Zunahme d. abgespalt. P. (%)				1,40		6,16		5,69	
Cholatgehalt. (mg%)	0		5		10		25		0

TABELLE III.
Versuch mit Leber.

Nr. d. Versuche.	A		B		C		D		E
	ermitt. P. mg	abgespalt. P. (A-E) mg	ermitt. P. mg	abgespalt. P. (B-E) mg	ermitt. P. mg	abgespalt. P. (C-E) mg	ermitt. P. mg	abgespalt. P. (D-E) mg	Kontrolle P. mg
1	9,77	1,59	9,84	1,66	9,91	1,73	9,74	1,56	8,18
2	9,74	1,36	9,84	1,46	9,74	1,36	9,74	1,36	8,38
3	9,79	1,48	9,91	1,60	9,84	1,53	9,87	1,56	8,31
4	9,74	1,61	9,77	1,64	9,79	1,66	9,74	1,61	8,13
5	9,71	1,42	9,75	1,46	9,77	1,49	9,82	1,53	8,29
6	9,71	1,47	9,68	1,44	9,71	1,47	9,77	1,53	8,24
7	9,73	1,44	9,75	1,46	9,75	1,46	9,73	1,44	8,29
Durchschnitts- wert.		1,49		1,53		1,53		1,51	
Zunahme d. abgespalt. P. (%)				2,68		2,68		1,34	
Cholatgehalt. (mg%)		0		5		10		25	0

2. *Dialysat von autolysierten Organen als Fermentlösung.*

Die Fermentlösung aus der Niere und der Leber von Kaninchen wurde nach den Angaben von Asakawa (1928) über Gewebephosphatase durch Dialyse hergestellt. Der Brei der Organe wurde mit einer zehnfachen Menge von Chloroformwasser gut durchgerührt und 2 Tage lang im Brutschrank bei 37°C autolysiert. Dieses Autolysat wurde mit Essigsäure schwach sauer angesäuert, noch 1 Tag im Brutschrank stehen gelassen und abfiltriert. Das Filtrat wurde in Kollodiummembran 48 Stunden lang gegen fließendes Wasser dialysiert. Das Dialysat war vollkommen klar, schwach gelblich gefärbt und frei von anorganischem Phosphor. Dieses Dialysat wurde als Fermentlösung zum Versuch verwendet. Die Versuchsanordnungen sind in Tabelle I gegeben; die Versuchsbedingungen waren genau die gleichen wie zuvor. Hierbei wurde die aus Lecithin abgespaltene säurelösliche Phosphorsäure nach King (1931) ermittelt.

a) *Versuch mit Niere.*

Aus der Tabelle IV ersieht man, dass die Spaltung der säurelöslichen Phosphorsäure aus Lecithin durch Nierenlecithinase bei Zusatz von Cholsäure im allgemeinen herabgesetzt wird, obwohl diese Herabsetzung je nach dem Gehalt an Cholsäure ganz verschieden auftritt.

Bei 5 mg%igem Cholsäuregehalt wird die säurelösliche Phosphorsäurespaltung im Vergleich zu der der Kontrolle durchschnittlich um 2,2%, bei 10 mg%igem Gehalt um 3,2% und bei 25 mg%igem um 4,5% herabgesetzt. Somit wird die säurelösliche Phosphorsäurespaltung aus Lecithin durch Nierenlecithinase durch Zusatz von Cholsäure um so stärker gehemmt, je mehr Cholsäure die Versuchslösung enthält.

b) *Versuch mit Leber.*

Die Spaltung der säurelöslichen Phosphorsäure aus Lecithin durch Leberlecithinase wird bei 5 mg%igem Cholsäuregehalt durchschnittlich um 3,2%, bei 10 mg%igem um 5,0% und bei

TABELLE IV.
Versuch mit Niere.

Nr. d. Versuche	A		B		C		D		E
	ermitt. P. (säure- lösl. P.) mg	abgespalt. P. (A-E) mg	ermitt. P. (säure- lösl. P.) mg	abgespalt. P. (B-E) mg	ermitt. P. (säure- lösl. P.) mg	abgespalt. P. (C-E) mg	ermitt. P. (säure- lösl. P.) mg	abgespalt. P. (D-E) mg	Kontrolle P. mg
1	3,39	3,02	3,30	2,93	3,19	2,82	3,16	2,79	0,37
2	3,92	3,52	3,65	3,25	3,61	3,21	3,58	3,18	0,40
3	3,31	3,01	3,29	2,99	3,27	2,97	3,24	2,94	0,30
4	3,26	2,96	3,22	2,92	3,16	2,86	3,12	2,82	0,30
5	3,56	3,21	3,52	3,17	3,62	3,27	3,56	3,21	0,35
6	3,46	3,16	3,39	3,09	3,42	3,12	3,42	3,12	0,30
7	3,26	2,96	3,26	2,96	3,19	2,89	3,12	2,82	0,30
Durchschnitts- wert.		3,12		3,05		3,02		2,98	
abgespalt. P. (%)		Kontrolle		97,8		96,8		95,5	
Cholatgehalt mg (%)	0		5		10		25		0

TABELLE V.
Versuch mit Leber.

Nr. d. Versuche	A		B		C		D		E
	ermitt. P. (säure- lösl. P.) mg	abgespalt. P. (A-E) mg	ermitt. P. (säure- lösl. P.) mg	abgespalt. P. (B-E) mg	ermitt. P. (säure- lösl. P.) mg	abgespalt. P. (C-E) mg	ermitt. P. (säure- lösl. P.) mg	abgespalt. P. (D-E) mg	Kontrolle P. mg
1	3,36	2,89	3,36	2,89	3,19	2,72	3,12	2,65	0,47
2	3,02	2,69	2,93	2,60	2,95	2,62	2,88	2,55	0,33
3	3,17	2,84	3,05	2,72	3,00	2,67	2,95	2,62	0,33
4	3,15	2,80	3,11	2,76	3,08	2,73	3,06	2,71	0,35
5	3,19	2,86	2,99	2,66	2,93	2,60	2,89	2,56	0,33
6	3,25	2,78	3,25	2,78	3,19	2,72	3,06	2,59	0,47
7	3,15	2,82	2,99	2,66	2,93	2,60	2,86	2,53	0,33
Durchschnitts- wert.		2,81		2,72		2,67		2,60	
abgespalt. P. (%)		Kontrolle		96,8		95,0		92,5	
Cholatgehalt (mg%)	0		5		10		25		0

25 mg-%igem um 7,5% im Vergleich zu der der Kontrolle herabgesetzt, wie aus der Tabelle V ersichtlich ist. Auch bei der Leber wird die Spaltung der säurelöslichen Phosphorsäure um so stärker durch die Cholsäure herabgesetzt, je mehr Cholsäure in der Versuchslösung enthalten ist. Diese hemmende Wirkung der Cholsäure auf die Lecithinase tritt bei der Leber stärker auf als bei der Niere.

3. Chloroformwasserextrakt der Leber als Fermentlösung und bei Autolyse von verschiedener Zeitdauer.

Der Leberbrei wurde mit einer fünffachen Menge von Chloroformwasser durchgerührt und unter Zusatz von Toluol 24 Stunden lang bei Zimmertemperatur unter gelegentlichem Umschütteln stehen gelassen. Diese Breilösung wurde durch Watte abfiltriert, und das Filtrat bei 37°C in den in Tabelle VI angegebenen Anordnungen der Autolyse von verschiedenen Tagen unterworfen. Dann wurden 20 ccm davon abpipettiert und die befreite freie Phosphorsäure und die säurelösliche Phosphorsäure darin nach Neumann titrimetrisch ermittelt.

TABELLE VI.
Versuchsanordnung.

	A	B	C	D
Breilösung(ccm)	150	150	150	150
0,4% Natr. Cholatlös. (ccm)	0	2	4	10
Wasser(ccm)	10	8	6	0
Toluol(ccm)	5	5	5	5

Aus den Tabellen VII u. VIII ist zu ersehen, dass die befreite freie Phosphorsäure und die säurelösliche Phosphorsäure im Laufe der Tage allmählich zunimmt, und dass diese Zunahme um so stärker wird, je mehr Cholsäure in der Versuchslösung enthalten ist.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Lecithin wird durch Chloroformwasserextrakte von Leber

TABELLE VII.

Tage.	A		B		C		D	
	Anorg. P. mg%	Säure- lösl. P. mg%	Anorg. P. mg%	Säure- lösl. P. mg%	Anorg. P. mg%	Säure- lösl. P. mg%	Anorg. P. mg%	Säure- lösl. P. mg%
0	16,38	24,43	16,38	24,43	16,38	24,43	16,38	24,43
1	22,10	26,76	21,94	26,76	22,10	27,15	22,10	26,92
2	23,77	26,95	23,77	27,15	23,66	27,34	23,77	27,15
3	24,79	27,92	24,60	27,92	24,79	28,31	24,98	28,70
5	25,21	28,61	25,21	28,97	25,37	28,97	25,37	29,25
7	25,68	29,09	25,76	29,47	25,93	29,80	26,12	29,64
9	26,45	30,03	26,94	30,30	26,84	30,47	27,12	30,86

TABELLE VIII.

Tage.	A		B		C		D	
	Anorg. P. mg%	Säure- lösl. P. mg%	Anorg. P. mg%	Säure- lösl. P. mg%	Anorg. P. mg%	Säure- lösl. P. mg%	Anorg. P. mg%	Säure- lösl. P. mg%
0	15,78	23,93	15,97	23,93	15,87	23,93	15,87	23,93
1	21,52	24,82	21,52	25,21	21,42	24,43	21,60	25,21
2	23,55	25,98	23,66	25,98	23,55	26,37	23,66	26,76
3	24,72	27,15	24,43	27,53	24,43	27,53	24,24	27,31
5	25,10	28,48	25,10	28,31	25,21	28,70	25,21	28,70
7	25,82	28,86	25,71	28,86	25,98	29,09	26,26	29,47
9	26,18	30,64	26,65	30,86	26,56	31,02	26,56	31,41

und Niere des Kaninchens unter Abspaltung von Phosphorsäure hydrolysiert. Diese Phosphorsäureabspaltung aus Lecithin, veranlasst sowohl durch Nierenferment als auch durch Leberferment, wird durch Zusatz von Cholsäure etwas gesteigert.

2. Die Abspaltung der säurelöslichen Phosphorsäure aus Lecithin mittelst der dialysierten Fermentlösung der Leber und der Niere nach Asakawa wird durch Zusatz von Cholsäure stark gehemmt. Diese Hemmung ist um so stärker, je mehr Cholsäure in der Versuchslösung enthalten ist. Die durch Cholsäure herabgesetzte Phosphorsäureabspaltung tritt bei Leberferment stärker

auf als bei Nierenferment.

3. Im Autolysenversuch der Leber von Kaninchen vermehrt sich die anorganische Phosphorsäure und die säurelösliche Phosphorsäure mit der Zeit. Diese Vermehrung wird durch Zusatz von Cholsäure gefördert und ist um so stärker, je mehr Cholsäure in der Versuchslösung enthalten ist.

LITERATURE.

- Akamatsu, S. (1923): *Biochem. Z.*, **143**, 186.
 Asakawa, K. (1928): *Jl. of Biochem.*, **10**, 157.
 Bokay, A. I. (1887): *Zschr. physiol. Chem.*, **1**, 157.
 Bianco, J. (1930): *Ber. ü. die ges. Physiol.*, **54**, 658, zitiert von Fromherz.
 Fuziwaru, K. (1931): *Jl. of Biochem.*, **13**, 43.
 Hatakeyama, T. (1927): *Jl. of Biochem.*, **8**, 261.
 Karasawa, R. (1927): *Jl. of Biochem.*, **7**, 145.
 Karasawa, R. (1926): *Jl. of Biochem.*, **6**, 139.
 Kazirow, K. u. Tsuji, K. (1930): *Jl. of Biochem.*, **11**, 333.
 Kay, H. D. (1926): *Biochem. Jl.*, **20**, 791.
 Kay, H. D. (1928): *Biochem. Jl.*, **22**, 855.
 Kay, H. D. (1930): *Biochem. Jl.*, **24**, 249.
 King, H., King, E. J. u. Page, I. H. (1930): *Zschr. physiol. Chem.*, **191**, 243.
 King, E. J. (1931): *Biochem. Jl.*, **25**, 799.
 Kutscher, Fr. u. Lohmann. (1903): *Zschr. physiol. Chem.*, **39**, 159.
 Levene, P. A. u. Rolf, I. P. (1927): *Jour. of biolog. Chem.*, **72**, 587.
 Marstrand, M. u. Robison, R. (1926): *Biochem. Jl.*, **20**, 847.
 Marstrand, M. u. Robison, R. (1927): *Biochem. Jl.*, **21**, 665.
 Mayer, P. (1906): *Biochem. Z.*, **1**, 39.
 Neuberg, C. (1918): *Biochem. Z.*, **88**, 432.
 Neuberg, C. (1926): *Biochem. Z.*, **171**, 485.
 Neuberg, C. (1928): *Biochem. Z.*, **199**, 498.
 Okamura, T. (1928): *Jl. of Biochem.*, **8**, 391.
 Porter, A. E. (1917): *Biochem. Jl.*, **10**, 523.
 Portis, S. A. (1929): *Ber. ü. die ges. Physiol.*, **48**, 816, zitiert von Gottschalk.
 Robison, R. (1923): *Biochem. Jl.*, **17**, 286.
 Robison, R. u. Soames, K. M. (1924): *Biochem. Jl.*, **18**, 740.
 Robison, R. u. Soames, K. M. (1925): *Biochem. Jl.*, **19**, 153.
 Shoda, M. (1926): *Jl. of Biochem.*, **6**, 395.
 Schmoff-Simanowski, C. u. Sieber, N. (1906): *Zschr. physiol. Chem.*, **49**, 50.
 Sekitoo, T. (1929): *Jl. of Biochem.*, **11**, 251.
 Simon, F. (1911): *Zschr. physiol. Chem.*, **72**, 463.

- Takata, H. (1931): *Jl. of Biochem.*, **14**, 61.
Thiele, F. H. (1913): *Biochem. Jl.*, **7**, 275.
Viale, C. u. Combes, T. (1927): *Ber. ü. die ges. Physiol.*, **40**, 584,
zitiert von Mona Spiegel-Adolf.
Waldvogel. (1904): *Zschr. physiol. Chem.*, **42**, 200.
Wohlgemuth, J. (1912): *Biochem. Z.*, **39**, 302.

ON THE METHOD OF QUANTITATIVE ESTIMATION OF GLUTATHIONE IN TISSUES.

By

YUZURU OKUDA AND MASAYOSHI OGAWA.

*(From the Biochemical Laboratory of the Department of Agriculture,
Kyushu Imperial University, Fukuoka.)*

(Received for publication, April 12, 1933.)

INTRODUCTION.

In 1923, Okuda published an iodometric method for the determination of cysteine in the hydrolysate of proteins. The basis of the method depends upon the fact that among the cleavage products of proteins cysteine alone reacts very actively with iodine, in 2 per cent solution of hydrochloric acid at room temperature. The principle of the method is to titrate in the acid solution in the presence of iodide with a standard iodate solution. This method is also used for the determination of cystine in proteins after reducing it with nascent hydrogen to cysteine.

In 1925, Tunnicliffe established a method determining reduced glutathione, extracting it from tissues with trichloroacetic acid and titrating with iodine solution. But Okuda (1929) pointed out the fact that sulfosalicylic acid is superior to trichloroacetic acid for this purpose, giving much more accurate results, and that in trichloroacetic acid solution the reduction of cystine to cysteine is incomplete, while in sulfosalicylic acid solution the reduction is complete. He described also that as a titrating solution for SH compounds, an iodate solution in the presence of some iodide is superior to an iodine solution, as it gives far more accurate results. Furthermore, iodate solution, as a rule, is more stable than free iodine solution. Thus, he concluded that the titration of SH group with iodine solution in trichloroacetic acid gives no reliable results, and that S.S compounds cannot be determined with accuracy in trichloroacetic acid solution. Taking these facts into

consideration, he established a method for estimating cysteine (or SH compounds) and cystine (or S.S compounds) in tissues and biological fluids. According to this method, samples are extracted with sulfosalicylic acid. Cysteine compounds are estimated in this acid solution by titrating with $M/500$ potassium iodate solution in the presence of a certain quantity of potassium iodide. Cystine compounds, after being reduced at 100° into cysteine compounds, are estimated in the same way. In this titration, starch is used as an internal indicator when the solution is somewhat colored.

The drawback of Tunnicliffe's method for determining glutathione, by titrating with iodine in a trichloroacetic acid filtrate, was lately suggested also by the findings of Gulland and Peters (1930), and of Schelling (1932).

The Hess method (1929) of determining glutathione is a modification of the Okuda (1925) iodate titration for cysteine. For the estimation of reduced glutathione he used 10 cc. of a molybdic acid filtrate, to which some hydrochloric acid and potassium iodide were added, and titrated at 20° with $M/1200$ potassium iodate.

Lately Woodward and Fry (1932) have called attention to the facts that no autoxidation of reduced glutathione takes place in 2 per cent sulfosalicylic acid filtrate for several hours and that the acid allows 100 per cent recovery of the glutathione added to blood. And they described a method determining glutathione, which is, however, based on the same principle as that of the above-mentioned Okuda's method, determining SH and S.S compounds (1929). Their method consists of titration of reduced glutathione in 10 cc. of 2 per cent sulfosalicylic acid filtrate with 0.001 N potassium iodate at 20° in the presence of potassium iodide, and of reduction of oxidized glutathione, before titration, by means of zinc in the acid solution at room temperature for 20 minutes.

The chief differences between their method and Okuda's are as follows: 1). According to their method the titration is made at 20° . 2). The reduction is carried out at room temperature for 20 minutes. 3) The results of titration are calculated as reduced or oxidized glutathione, instead of as cysteine or cystine. But the

processes 1 and 2 are not suitable for the determination, as they give inaccurate results, as will be shown in this communication, under the headings c and d in the chapter dealing with the Preliminary Experiments.

Consequently, to improve these points we propose here a new method determining glutathione. The general plan of this method is analogous with that of Okuda's method determining SH and S.S compounds.

In the present paper we describe, for the sake of convenience, first the method of determination, next the preliminary experiments performed to establish the method, and, last, some application of the method.

I. THE METHOD.

Principle:—Tissues are freed from proteins by means of sulfosalicylic acid, and the filtrate from the protein-coagulum is divided into 2 portions. In one portion, reduced glutathione (GSH) is determined, and in the other, total glutathione. Oxidized glutathione (GS.SG) is calculated from the difference.

Solutions required:—

- 1) About 5% KI aqueous solution.
- 2) $N/2$ sulfosalicylic acid solution:—Decolorize sulfosalicylic acid solution with charcoal, and make 1 cc. of the solution to correspond to 5 cc. of $N/10$ NaOH.
- 3) $N/4$ sulfosalicylic acid solution.
- 4) 1% starch solution—Dissolve 1 g. of starch in 10 cc. of boiling water and add 90 cc. of 5% KI solution.
- 5) $M/10000$ KIO_3 solution— $M/100$ KIO_3 solution, which keeps over 1 year, is prepared as a stock solution dissolving 0.214 g. of pure potassium iodate in 100 cc. of $N/4$ sulfosalicylic acid. The $M/10000$ KIO_3 solution to be used in the titration is made by diluting the stock solution with 100 times its volume of $N/4$ sulfosalicylic acid. Since this loses its strength slowly, a fresh solution should be made every 3 days.

Procedure:—Take from 1 to 10 g. of fresh tissue paste or biological fluid in a small mortar, add immediately from 1 to 10 cc. of $N/2$ sulfosalicylic acid,¹⁾ extract the soluble matter from the coagulum by grinding and stirring. Decant the liquid into a 50 cc. volumetric cylinder, repeat the extraction with $N/4$ sulfosalicylic acid, and finally transfer both the liquid and the coagulum into the cylinder and make up to the volume of 50 cc. with $N/4$ sulfosalicylic acid. Shake it from time to time; leave it for about half an hour at room temperature; and then filter it through a dry filter paper in a dried flask. The filtrate, which usually occupies about 45 cc., is divided into 2 portions for the estimation of reduced and oxidized glutathiones.

GSH:—Take 10 cc. of the filtrate in a small Erlenmeyer flask; add to it, 2 cc. each of 5% KI and $N/2$ sulfosalicylic acid solutions and one drop of the starch solution. Place the flask in a beaker of ice water with a little table salt. Keeping the content of the flask at 0°, titrate with $M/10000$ KIO_3 solution, by running it from a micro-burette, until the first blue color persists. For this titration, a white back-ground should be used. When 0.5 mg. of pure reduced glutathione in 10 cc. of $N/4$ sulfosalicylic acid is titrated under this condition, 2.3 cc. of the iodate is required. Consequently, the quantity of reduced glutathione contained in 10 cc. of the unknown filtrate is calculated as follows:—

$$0.5 \times \frac{\text{Required cc. of } M/10000 \text{ } KIO_3}{2.3} = \text{mg. GSH in 10 cc.}$$

GS.SG:—Take 20 cc. of the filtrate in a small flask, add to it about 0.5 g. of zinc dust, and boil for 20 minutes very gently for the complete reduction of oxidized glutathione into the reduced form. Filter it through a small Buchner funnel, wash the excess of zinc several times with a few cc. of $N/4$ sulfosalicylic acid by running it from a burette, and make up to 30 cc. with the acid solution. Take 10 cc. of the resultant solution, and determine total GSH according to the above-stated procedure. The quantity of

1) In case a dried specimen is dealt with, $N/4$ sulfosalicylic acid should be used, instead of $N/2$.

oxidized glutathione is obtained by the difference between the total and preexisting GSH.¹⁾

II. PRELIMINARY EXPERIMENTS.

To establish the method mentioned above, the following experiments were carried out.

A. Stability of $M/10000$ KIO_3 Solution.

In a certain degree of concentration, potassium iodate solution keeps indefinitely, but very dilute solution such as $M/10000$ loses its strength slowly. We confirmed that $M/10000$ KIO_3 solution, kept at 20° – 25° , gives the theoretical titer against reduced glutathione, at least for 3 days.

B. Filtration.

For the filtration of the protein-coagulum obtained by the addition of sulfosalicylic acid to tissues and biological fluids, 2 methods were compared, using the sample solutions containing milk and a definite quantity of reduced glutathione. 1) Filtration by the use of a Buchner funnel, suction and washing. 2) Filtration through a dried filter paper into a dried flask, and no washing. The results were as follows:—

	GSH added	GSH found
1)	0.61 mg.	0.63 mg.
2)	0.61 „	0.62 „

From these results it is observed that the absorption of the reduced glutathione by the protein-coagulum, even in the second method, is so slight as to fall within the limits of experimental error. The first method required much time, while the second is rapid and advantageous.

C. Influence of Temperature, and Concentration of Glutathione.

The requirement of potassium iodate for a definite quantity of

1) The coefficient between GS.SG and GSH is taken to be 1.0, as is shown in the Preliminary Experiment d.

glutathione is different at different temperatures. And also the requirement is not proportional to the quantity of glutathione at a higher temperature, the discrepancy being greater, the higher the temperature. To show these facts, many experiments were made at different temperatures, but, for the sake of brevity, the records of the two cases of 20° and 0° only will be cited here. Certain quantities of reduced glutathione were dissolved in 10 cc. each of water and of milk-filtrate, containing sulfosalicylic acid in such a concentration as $N/4$, and titrated with $M/10000$ KIO_3 solution with the following results:—

GSH titration in pure solution.

In 10 cc. sample		20°		0°	
GSH used, mg.	Ratio	KIO_3 required, cc.	Ratio	KIO_3 required, cc.	Ratio
1.0	4	4.84	3.6	4.60	4
0.5	2	2.69	2.0	2.30	2
0.25	1	1.34	1.0	1.15	1

GSH titration in milk-filtrate.

In 10 cc. sample		20°		0°	
GSH used, mg.	Ratio	KIO_3 required, cc.	Ratio	KIO_3 required, cc.	Ratio
5.0	10	24.9	8.9	22.5	9.7
0.5	1	2.8	1.0	2.3	1.0

From these results it will be seen that the quantity of the iodate required for titration are nearly proportional to that of reduced glutathione used, both in a pure solution or in a biological solution, if the titration is carried out at 0°, but it is not so at 20°. Consequently, the aforesaid Woodward and Fry's method (1932), in which titration is performed at 20° seems to be inaccurate.

D. Reduction.

The reduction of pure oxidized glutathione by means of zinc powder and sulfosalicylic acid is perfect even at room temperature.

But when some impurities are present in the solution it is not so readily reduced as in the case of the pure solution. In the case of milk solution, for instance, the reduction of oxidized glutathione is not completed at room temperature, and for complete reduction it is necessary to boil about 20 minutes. This is similar to the case of cystine which had been brought to light by Okuda (1929). To show these facts the records of the two experiments are given below.

Experiment 1. The solution of reduced glutathione was buffered to pH 7.6 and completely oxidized by bubbling air through it, until the nitroprussid reaction ceased. The solution of oxidized glutathione thus prepared was made to $N/4$ acidity with sulfosalicylic acid and treated with zinc powder, either at room temperature (17° – 18°) or at its boiling temperature. Many experiments were carried out but the case of 20 minutes only is recorded as follows:—

	Room temp.	Boiling temp.
GSH found in per cent of GSH used	99.6	99.6

In these experiments, the change of substances are $\text{GS.SG} \rightarrow \text{GSH}$, and the theoretical change of their quantities should be $614.4 \rightarrow 612.4 \rightarrow 614.4$; namely, the ratio $100 \rightarrow 99.6 \rightarrow 100$. But from these experimental results, it is seen that 99.6 of GS.SG gave 99.6 of GSH, slight decomposition occurring during the reduction, that is to say, a certain quantity of oxidized glutathione gave rise to an equal quantity of the reduced form. Consequently, coefficient 1.0 was used in the method described above.

Experiment 2. A certain quantity of oxidized glutathione was added to milk. From this solution, proteins were removed by means of sulfosalicylic acid, and the filtrate was made to $N/4$ acidity of the acid. Two portions of the filtrate were treated with zinc for 20 minutes,—one at room temperature (18°) and the other at gently boiling temperature. Then the reduced glutathione was determined as follows:—

	Room temp.	Boiling temp.
GSH found in per cent of GSH used	87.8	101.0

From the results it will be noted that with the pure solution of oxidized glutathione, the reduction is complete at room temperature for 20 minutes, as is shown in Experiment 1, but it is not so in the milk-filtrate, in which many substances other than glutathione are present. Another experiment performed with the white of egg gave a similar result to that of milk. Consequently, Woodward and Fry's method (1932), in which the reduction of oxidized glutathione in a biological filtrate is made at room temperature for 20 minutes, seems to give inaccurate results. Attention should be called to boiling the solution gently for 20 minutes, for complete reduction of oxidized glutathione in a biological filtrate.

E. Volume of Sample Solution.

In order to ascertain the influence of the volume of glutathione solution to be examined upon the determination, an experiment was carried out. A definite quantity of reduced glutathione was dissolved in 10, 20 and 30 cc. of $N/4$ sulfosalicylic acid, and the solutions were titrated at the same temperature with the iodate solution. The volumes of the iodate solution required were 2.6, 2.8 and 2.9 cc. respectively. Since the volume of the solution has some influence, as is shown in this experiment, 10 cc. of the solution was always used for titration.

F. Concentration of Iodate Solution.

For the titration, the iodate solution is to be made as dilute as possible, if a distinctive end-point is given. In view of this, some experiments were made, and it was found that $M/10000$ KIO_3 is most advantageous.

G. Concentration of Acid.

To ascertain the influence of the acidity of glutathione solution to be examined upon the requirement of the iodate solution, a definite quantity of reduced glutathione was dissolved in 10 cc. of 0.19, 0.25 and 0.93 N sulfosalicylic acid, and titrated at the same temperature with the iodate solution. The requirement of it was 0.51, 0.51 and 0.50 cc. respectively. Consequently, so far as

the experiments performed, nearly no influence of the concentration of the acid was observed. This is not the case with cysteine as was pointed out by Okuda (1925), and this fact simplifies the method for determining glutathione.

H. The End-Point of Titration.

For the purpose of determining the end-point of titration, 2 methods were compared. One was the usual iodometry in which starch was used as an internal indicator, and the other, the potentiometric method, such as was used by Yamazaki (1930), in which potential spring was observed.

Many flasks containing 0.5 mg. of reduced glutathione, 10 cc. of $N/4$ sulfosalicylic acid, and 2 cc. each of 5% potassium iodate and $N/2$ sulfosalicylic acid, were prepared. They were divided into 2 groups, and titration was made with $M/10000$ KIO_3 , in one group starch being used as indicator and in the other electromotive force being measured. The requirements in cc. of the iodate solution were as follows:—

Temperature of sample solution.	Starch-titration.	Electro-titration.
0°	2.30	2.30
16°	2.61	2.53
20°	2.69	2.57

Namely, the results of the 2 different methods are similar if the titration is made at 0°, but at higher temperature it is not so. In the case of our method of estimating glutathione in which titration is made at 0°, the advantage of the use of starch over the electric titration is sufficiently obvious when the simplicity and rapidity of the former is taken into account.

I. Glutathione used.

The crystals of glutathione used in the experiments mentioned above had the following elementary composition.

Found	13.30% N	10.20% S
Calc. as GSH ($C_{10}H_{17}O_6N_3S$)	13.67	10.42

From this result the purity of the crystals was calculated to

be 97.5 per cent. Consequently, when the use of pure glutathione was necessary, the quantity of the crystals actually weighed was multiplied by the coefficient 0.973.

To ascertain whether the crystals are reduced glutathione or a mixture of reduced and oxidized forms, as the elementary analyses have nothing to show, the two following experiments were made. 1) The solution of the crystals was divided into 2 portions, A and B; in A, reduced glutathione was determined directly as usual, while in B, after reduction, the sum of reduced glutathione and oxidized form, if any was present. The results thus obtained corresponded to 31.03 and 30.93 mg. of GSH respectively. Therefore, it is evident that there was not any oxidized glutathione present in the crystals. 2) The crystals were hydrolyzed with hydrochloric acid, avoiding oxidation in a continuous current of CO₂ gas. The solution was divided into 2 portions, C and D; in C, cysteine was determined by Okuda's method, and in D, the sum of cysteine and cystine in the form of cysteine. The results obtained were 38.26 and 38.03 mg. of cysteine respectively. It is obvious, therefore, that there was neither cystine in the hydrolysate of the crystals nor oxidized glutathione in the crystals applied.

From these experiments it is concluded that the crystals used are practically pure reduced glutathione.

III. APPLICATION OF THE METHOD.

A. Availability of the Method.

In order to ascertain the accuracy of the present method, the following quantities of reduced and oxidized glutathiones were added to water, to milk and to the white of egg respectively, and the determinations were made by means of the method, with the following results:—

Form of Glutathione	Glutathiones added	Glutathiones found					
		In water		In milk		In egg white	
GSH	36.2 mg.	36.1 mg.	99.7%	36.7 mg.	101.4%	36.5 mg.	101.1%
GS.SG	20.2	20.2	100.0	20.4	101.9	20.0	99.0

From these results it is clear that the added glutathiones were nearly recovered theoretically. Therefore, the method can be used.

B. Estimation in Animal Tissues.

A rabbit, a hen and a carp were killed and the determinations of reduced and oxidized glutathiones were carried out immediately with the following results:—

	Reduced and oxidized glutathiones in mg. per cent.					
	Rabbit		Hen		Carp	
	GSH	GS.SG	GSH	GS.SG	GSH	GS.SG
Heart	79.8	11.0	99.8	3.2	34.8	4.0
Pancreas	6.9	9.9	124.5	11.0	—	—
Testes	132.0	3.7	—	—	54.9	2.7
Spleen	102.7	7.3	—	—	75.0	15.4
Kidney	97.2	2.8	202.6	5.4	54.1	7.9
Lung	46.9	1.0	69.1	18.9	—	—
Liver	179.4	2.8	230.0	3.3	63.4	5.3
Gall-bladder	86.8	1.6	130.0	73.8	60.8	15.2
Brain	—	—	100.4	8.0	—	—
Muscle	—	—	26.0	6.6	16.7	2.3

All the animal tissues examined contained reduced and oxidized glutathiones, namely, a little in muscles, comparatively much in livers, testes and kidneys. In these fresh tissues, reduced glutathione is always overbalancing the other.

C. Estimation in Plants.

The contents of reduced and oxidized glutathiones in plants were examined, and the results are shown in the following tables:—

Reduced and oxidized glutathiones in mg. per cent.					
	GSH	GS.SG		GSH	GS.SG
Garlic	8.2	105.7	Onion	4.8	25.3
Potato	4.9	16.8	Apple	3.3	0.8
Radish	20.6	1.1	Lemon	35.2	38.1

SUMMARY.

1. A method of estimating reduced and oxidized glutathiones in tissues and in biological fluids was described. The principle of the method is analogous to that of determining cysteine and cystine, which has already been set forth by Okuda (1929). In this method, first of all, proteins are removed by means of *N*/4 sulfo-salicylic acid, and the filtrate is divided into two portions. In one portion, reduced glutathione is estimated directly by titration at 0° with the standard iodate solution in the presence of a certain quantity of iodide and starch. In the other, oxidized glutathione, after being reduced into reduced form by boiling the acid solution with zinc powder, is estimated in the same way.

2. For the purpose of establishing this method some preliminary experiments were carried out among which the titration at 0° and the reduction for 20 minutes at the boiling temperature are emphasized.

3. By the use of this method, glutathiones, both reduced and oxidized, were estimated in some animal and plant tissues.

REFERENCES.

- Gullard and Peters (1930): *Biochem. J.*, **24**, 91.
Hess (1929): *J. Washington Acad. Sc.*, **19**, 419.
Okuda (1923): *J. Scient. Agr. Japan*, **253**, 784.
Okuda (1925): *J. Dep. Agr. Kyushu Imp. Univ.*, **1**, 163.—*J. Biochem. Japan*, **5**, 201.
Okuda (1929): *J. Dep. Agr. Kyushu Imp. Univ.*, **2**, 133.
Pirie (1930): *Biochem. J.*, **24**, 51.
Schelling (1932): *J. Biol. Chem.*, **96**, 17.
Tunnicliffe (1925): *Biochem. J.*, **19**, 194.
Woodward and Fry (1932): *J. Biol. Chem.*, **97**, 465.
Yamazaki (1930): *J. Biochem. Japan*, **12**, 207.

ÜBER DIE PHOSPHAMIDASE.

VON

MASAO ICHIHARA.

*(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Akademie
zu Chiba, Direktor: Prof. S. Akamatsu.)*

(Eingegangen am 24. April 1933.)

Die systematischen Proteasenstudien von Waldschmidt-Leitz und Grassmann sind das wertvollste Ergebnis in der Biochemie der jüngsten Zeit. Diese Autoren konnten den Zusammenhang der Fermentspezifität und der chemischen Konstitution der Substrate in schöner Weise aufklären. Hinsichtlich der Phosphatase wurden manche wertvollen Arbeiten aus dem biochemischen Institut in Dahlem berichtet, und der Wirkungsbereich dieses Ferments wurde durch die Forschung von Herrn Professor Neuberg und seinen Mitarbeitern bemerkenswert erweitert. Im hiesigen Institut wurde seit einigen Jahren die analytische Differenzierung der Phosphatase unternommen. Wir konnten dadurch Phosphomonoesterase, Phosphodiesterase und Pyrophosphatase untereinander isolieren.

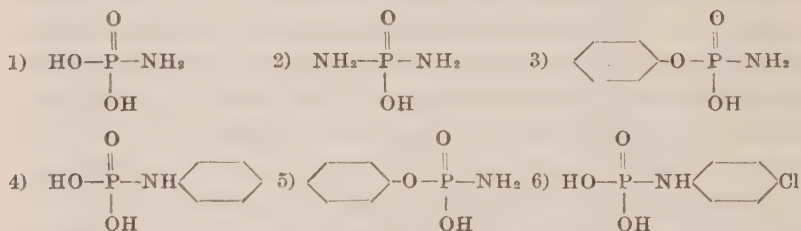
Die bisher als fermentativ angreifbar bewiesenen Bindungsformen der Phosphorsäure waren entweder P-O-C oder P-O-P. Ausser den künstlich aufgebauten Phosphorsäureestern wurden auch manche Naturstoffe von der P-O-C-Bindungsform untersucht: Zucker-Phosphorsäure, Phytin, Phosphatid, Nukleotid und Nukleinsäure. Für die fermentative Hydrolyse der Nukleinsäure ist die kürzlich veröffentlichte Mitteilung von Takahashi (1932) besonders wertvoll. Als Substanz von der P-O-P-Bindungsform kommt in der Natur ausser Pyrophosphorsäure noch die Adenylpyrophosphorsäure vor.

In der vorliegenden Mitteilung wird die fermentative Spaltung der P-N-Bindung angegeben werden. Eine solche Bindungsform des Phosphors ist unter den Naturstoffen nur in der Kreatin- und Arginin-Phosphorsäure zu finden. Ob diese Bindungsform in dem

Kaseinogen vorhanden ist, bleibt noch ungeklärt.

Der Verfasser wollte entscheiden, ob die P-N-Bindung überhaupt fermentativ aufspaltbar sei und weiter, wenn dies der Fall ist, ob das daran teilnehmende Ferment von den bisher isolierten Phosphatasen differenziert werden könne. Die Experimente wurden unter der Leitung von Prof. Akamatsu ausgeführt.

Die nachstehenden Verbindungen wurden für die Versuche dargestellt: 1) Phosphorsäure-Monoamid, 2) Phosphorsäure-Diamid, 3) Phenylphosphorsäure-Monoamid, 4) Phosphorsäure-Diamid, 3) Phenylphosphorsäure-Monoamid, 4) Phosphorsäure-Anilid, 5) Phenylphosphorsäure-Anilid und 6) Phosphorsäure-p-Chloranilid.



Die gebrauchten Fermente waren Schweinenieren-, Reiskleien- und Takadiastasenlösung, weil diese Lösungen nach der Erfahrung bei den Phosphatasen-Studien im hiesigen Institut zuerst auf ihre Wirksamkeit geprüft werden sollten.

Im Gegensatz zu der P-O-C oder P-O-P-Bindung ist die P-N-Bindung im allgemeinen labil. Mit der Steigerung der Wasserstoffionenkonzentration des Mediums nimmt die Labilität immer zu. Daher musste man jedesmal die Kontrollversuche unter denselben Bedingungen wie bei den Hauptversuchen ansetzen und, da eine spontane Spaltung bei den Kontrollen bewiesen wurde, die Existenz der phosphatatischen Hydrolyse aus der bei beiden Versuchsreihen gefundenen Differenz der anorganischen Phosphormenge beurteilen. Theoretisch betrachtet, vermindert sich die Konzentration der Substrate mit der Zeit erstens durch die fermentative Hydrolyse, zweitens aber auch durch die spontane Hydrolyse. Die beiden Reaktionen gehen Hand in Hand vor sich. Die Geschwindigkeit der Phosphorabspaltung wird also durch zwei

Reaktionskonstanten bedingt, die aber im vorliegenden Experimente nicht behandelt wurden. Daher kann über die P_H -Optima erst etwas bestimmtes ausgesagt werden, wenn unter den P -Differenzwerten der Haupt- und Kontrollversuche ein ausgeprägtes Maximum nachzuweisen ist, aber sonst nicht.

Die Experimente ergaben folgende Resultate:

Das Phosphorsäure-Monoamid ist durch Nieren-, Reiskleien- und Takaferment aufspaltbar. Das Nierenferment greift das Amid in alkalischer Reaktion bei P_H 9 optimal an. Auch bei saurer Reaktion ist das Amid hydrolysierbar, und das P_H -Optimum scheint in diesem Fall annähernd 3,3 zu sein; denn während die Differenz der P -Menge bei dem Haupt- und Kontrollversuche zwischen P_H 3,3 und 6,1 fast gleich ist, zeigten die Kontrollversuche bei P_H 3,3 eine grössere Selbstspaltung als bei P_H 5 oder 6. Das zweite Optimum in saurer Reaktion ist jedoch als nicht deutlich zu erwähnen. Das Reiskleienferment hydrolysierte das Phosphorsäure-Monoamid kräftig und optimal bei P_H 5,5. Auch in alkalischer Reaktion ist das Ferment gut wirksam, und ein zweites Optimum scheint bei P_H 8–8,7 vorhanden zu sein. Das Takaferment greift ebenfalls dasselbe Substrat an. Das P_H -Optimum ist 3,2. Bei P_H 6 scheint das zweite Optimum auch vorhanden zu sein.

Die fermentative Hydrolysierbarkeit der P - N -Bindung konnte damit erwiesen werden. Wir möchten dieses Ferment Phosphamidase benennen und der Phosphoesterase gegenüber stellen. Die vorliegenden Experimente wurden eigentlich seit zwei Jahren unternommen, denn die Aufnahme der Nomenklatur Phosphoesterase hat schon die Existenz der Phosphamidase vorausgesetzt. Die Isolierung der beiden Fermente voneinander wird weiter unten diskutiert werden.

Das Phosphorsäure-Diamid ist ebenfalls durch die oben erwähnten drei Fermente hydrolysierbar. Die Nierenphosphamidase spaltet die Verbindung sowohl in saurer als auch in alkalischer Reaktion. Die P_H -Optima sind 3,1 und 9. Das letztere Optimum ist aber nicht deutlich. Die Kleienphosphamidase hydrolysierte das Substrat optimal bei P_H 4,8. Das Takaferment wirkt optimal bei P_H 4, und ein undeutliches Optimum ist bei P_H 6

vorhanden. Wie aus den nachstehenden Protokollen ersichtlich, ist auch das Phosphorsäure-Diamid unbeständig und die spontane Dephosphorierung wird von Wasserstoffionen katalysiert. Diese Reaktion soll stufenweise vor sich gehen, nämlich erstens die Abspaltung eines Amidrests unter Bildung des Phosphorsäure-Monoamids und zweitens die Hydrolyse dieses Produkts in seine Bausteine. Bei der Monoamid-Hydrolyse war das Nieren- und Kleienferment bei $\text{pH } 9$ sehr wirksam, während das Diamid bei derselben Azidität nur durch das Nierenferment schnell aufspaltbar ist. Man kann vielleicht aus diesem Ergebnis die Existenz eines spezifischen Ferments, der Phosphodiamidase, annehmen, die das Diamid in Monoamid und Ammonium oder in allgemeinen Aminoverbindungen aufspaltet. Der direkte Beweis dafür fehlt jedoch vorläufig, aber wenn es der Fall ist, kann man die Phosphomonoamidase und Diamidase der von uns früher untersuchten Phosphomonoesterase und Diesterase gegenüber stellen.

Das Verhalten des Phosphorsäure-Monoamids in Betracht ziehend, ist es interessant, die fermentative Hydrolyse des Phenylphosphorsäure-Monoamids zu untersuchen. Das Experiment ergab, dass die Nieren-, Kleien- und Takafermente das Esteramid aufzuspalten vermochten, während diese Verbindung ohne Fermentzusätze selbst nach 24 Stunden keinen anorganischen Phosphor lieferte. Die maximale Ausbeute des anorganischen Phosphors wurde mit dem Nieren- und Takafermente bei $\text{pH } 2,2$ und mit dem Kleienferment bei $\text{pH } 3$ beobachtet. Die Optima gipfelten scharf ausgeprägt. Beim ersten Anblick ist das Optimum in so stark saurer Reaktion wie $\text{pH } 2$ sehr merkwürdig. Wir versuchten daher den Mechanismus der Phenylphosphorsäuremonoamidhydrolyse zu analysieren. Die labile Eigenschaft des Phosphorsäure-Mono- und Diamids in Betracht ziehend wurde vorausgesetzt, dass das Phenylphosphorsäuremonoamid auch durch das Wasserstoff-Ion katalytisch spontan desamidiert werden kann. Die Bildung des Phenylphosphats sollte dann mit der Zunahme der Azidität des Mediums immer mehr fortschreiten. Andererseits ist das pH -Optimum der Nieren- und Taka-Phosphomonoesterase, d.h. des ersten Typs dieser Fermentarten, $\text{pH } 3$ und das des Kleienferments,

das zu der Phosphomonoesterase vom zweiten Typ gehört, PH 5,6. Die Wirkung der Phosphomonoesterase vermindert sich daher allmählich, falls die Reaktion saurer wird als PH 3 bei dem Nieren- oder Takafermente und als 5,6 bei dem Kleienferment. Wenn sich also in der Lösung die spontane Bildung des Phenylphosphats und die phosphatatische Spaltung dieses Produkts Hand in Hand abspielen sollten, würde die maximale Ausbeute des anorganischen Phosphors, durch jene zwei konkurrierenden Reaktionen bedingt, bei einer solchen Azidität gegeben, die saurer als die optimale Azidität der respektiven Monoesterasen ist. Die spontane Desamidierung konnte experimentell tatsächlich bewiesen werden. Wir möchten also den Mechanismus der fermentativen Hydrolyse des Phenylphosphorsäureamids in saurer Reaktion so auffassen, dass diese Verbindung sich zuerst hauptsächlich spontan in Phenylphosphat und Ammonium aufspaltet, und dass dann das Phenylphosphat durch die Phosphomonoesterase angegriffen wird. Ob die Phosphamidase an jener Desamidierung in irgendeinem Betrag teilnimmt, ist nach der vorliegenden Versuchsanordnung schwer zu sagen.

Das Phenylphosphorsäureamid ist in alkalischer Reaktion durch das Nierenferment selbst nach 24 Stunden nicht dephosphorierbar. Da diese Fermentlösung eine kräftige Phosphomonoesterase enthält, kann die spontane Desamidierung in alkalischer Reaktion ausgeschlossen werden. Durch die Einführung des Phenylrests wird also das Phosphorsäureamid stabilisiert. Als man aber das Habu(*Trimeresurus flavoviridis*)-Gift auf das Phenylphosphorsäureamid einwirken liess, konnte bei PH 9 eine deutliche Zunahme des anorganischen Phosphors nachgewiesen werden. In dem Habu-Gift ist nach den Angaben von Uzawa (1932) und Takahashi (1932) Phosphodiesterase vorhanden. Dieselbe Giftlösung bewirkte auch die Phenolabspaltung aus dem Phenylphosphorsäureamid. Das Phosphorsäureamid selbst spaltet sich spontan nach 24 Stunden auch in alkalischer Reaktion in beträchtlichem Betrag. Bei PH 2 oder 3 führte aber die Giftlösung keine Dephosphorierung herbei. Die schnelle Spontandesamidierung in starker Azidität ist sicher eine Ursache der negativen Dephosphorierung.

Das Phosphorsäure-Monoanilid und das Phenylphosphorsäure-Monoanilid verhalten sich gegen das Nieren-, Kleien- und Takaferment in gleicher Weise wie die entsprechenden Monoamide. Das Phenylphosphorsäure-Monoamid spaltet sich hauptsächlich spontan zuerst in Phenylphosphat und Anilin, und das Phenylphosphat unterlag dann der Wirkung der Phosphomonoesterase.

Bei den fermentativen Versuchen mit Monoamiden oder Monoaniliden war es immer unangenehm, dass die Verbindungen labil sind und sich spontan hydrolysieren. Diese Eigenschaft haftet vielleicht allgemein an den Phosphorsäurederivaten vom P-N-Typ. Es war daher erwünscht, irgendeine P-N-Verbindung, die möglichst wenig unbeständig ist, zu suchen, und das Phosphorsäure-Mono-p-Chloranilid erfüllte partiell diesen Wunsch. Das Chloranilid wird in 1 Stunde in saurer Reaktion bis zu $\text{pH } 4$ nicht von selbst aufgespalten. Bei stärkerer Azidität nimmt die spontane Hydrolyse immer zu, aber in weit geringerem Grad als bei dem entsprechenden Monoamid oder Monoanilid. Die Fermentversuche wurden daher mit diesem Chloranilid ausgeführt. Die drei Fermentlösungen waren alle wirksam. Die Optima waren mit dem Nieren- und Takaferment bei $\text{pH } 2$, mit dem Kleienferment bei $\text{pH } 4,5$. Die optimale Hydrolyse in so stark saurer Reaktion wie $\text{pH } 2$ ist als sehr merkwürdig zu erwähnen.

Die säureamidartige Bindung der Phosphorsäure ist also fermentativ hydrolysierbar, was wir mit den synthetischen Substanzen experimentell nachweisen konnten.

Unsere nächste Aufgabe war zu bestimmen, was für ein Ferment an dieser Hydrolyse teilnimmt. Wir haben durch die Adsorptionsmethode von Willstätter die Isolierung der Fermente unternommen. Verschiedene Adsorptionsmittel wurden unter verschiedenen Bedingungen angewandt, und die folgenden Ergebnisse wurden erhalten: Kaolin oder Tonerde (γ) adsorbiert bei $\text{pH } 3$ die Phosphomonoesterase vollständig aber die Phosphamidase nur teilweise. Als die Nierenfermentlösung dagegen unter Zusatz von sekundärem Phosphat mit rotem Eisenhydroxydgel behandelt und die Adsorptionsrestlösung dialysiert wurde, spaltete diese Lösung zwar das Glycerophosphat, aber das Phosphorsäure-

Chloranilid gar nicht. Die Phosphomonoesterase und die Phosphamidase konnten damit von einander getrennt werden.

Zusammenfassend können wir sagen, dass in den tierischen und pflanzlichen Geweben ein spezifisches Ferment, die Phosphamidase, vorhanden ist, das für die Hydrolyse der säureamidartigen Bindung der Phosphorsäure eingerichtet ist. Dieses Ferment gehört zu der Phosphatase. Durch das analytische Verfahren kann man aber diese Phosphamidase von der Phosphomonoesterase unterscheiden. Die in der Natur vorhandenen säureamidartigen Phosphorsäureverbindungen sind, wie erwähnt, die Kreatin- und Argininphosphorsäure. Sie sind auch labil nach der allgemeinen Eigenschaft der P-N-Verbindungen. Von ihrer biologischen Bedeutung wissen wir nicht viel. Aber an ihrer Hydrolyse nimmt vielleicht die von uns untersuchte Phosphamidase teil, die von jenem Ferment, das den Phosphorsäureester des Zuckers aufspaltet, verschieden ist.

Experimenteller Teil.

I. DARSTELLUNG DER SUBSTRATE.

A. *Phenylphosphorsäure-Monoamid.*

Dieses Monoamid wurde nach Stokes (1894) dargestellt. Dafür wurde zuerst das Diphenylphosphorsäureamid vorbereitet, das, aus Chloroform umkristallisiert, bei 148° schmolz. Ausbeute 35%. Diese Verbindung wurde mit wässrigem Ammoniak partiell verseift, und das Ammoniumsalz des Phenylphosphorsäure-Monoamids endlich als schuppenartige Kristalle erhalten. Ausbeute 52%.

<i>Analyse:</i>	berechnet P	16.31%,
	gefunden P	16.26%.

B. *Phosphorsäure-Monoamid.*

Dieses konnte auch nach Stokes (1894) hergestellt werden, indem man das Diphenylphosphorsäureamid mit Kalilauge verseifte, und schliesslich wurde das saure Kaliumsalz des Monoamids

aus seiner konzentrierten wässrigen Lösung durch Umfällen mit Alkohol gereinigt. Ausbeute 56%.

<i>Analyse:</i>	berechnet P	22.99%,
	gefunden P	22.91%.

C. *Phosphorsäure-Diamid.*

Es wurde nach der Vorschrift von Stokes (1894) dargestellt. Dafür wurde das Phenylphosphorsäure-Diamid zuerst vorbereitet. Aus 95%igem Alkohol umkristallisiert war das Diamid in 50%iger Ausbeute zu bekommen. Schmelzpunkt 188°. Dieses Diamid wurde mit Kalilauge in der Hitze verseift, und dann wurde das Phosphorsäure-Diamid unter starkem Kühlen mit Eisessigzusatz als weissliches Pulver gefällt. Die Mutterlauge lieferte bei Alkoholzusatz eine weitere Kristallisation. Das Phosphorsäure-Diamid wurde weiter aus seiner kaltgesättigten Lösung mit Alkohol umgefällt. Ausbeute 80%.

<i>Analyse:</i>	berechnet P	32.29%,
	gefunden P	31.87%.

D. *Phenylphosphorsäure-Anilid.*

Zuerst wurde das Phenylphosphorsäure-Anilidchlorid nach der Methode von Michaelis (1903) dargestellt. Die nadelförmigen Kristalle, aus Benzol umkristallisiert, schmolzen bei 137°. Ausbeute 59%. Das Chlorid wurde dann mit verdünnter Natronlauge gespalten, und die freie Säure wurde in der Kälte mit Salzsäure gefällt. Der Niederschlag wurde dann mit Wasser bis zur Chlorfreiheit gewaschen und nach dem Trocknen aus Chloroform umkristallisiert. Das Phenylphosphorsäure-Anilid kristallisierte in Blättchen und schmolz bei 134°. Ausbeute 60%.

<i>Analyse:</i>	berechnet P	12.45%,
	gefunden P	12.35%.

E. *Phosphorsäure-Monoanilid.*

Das Monoanilid-Dichlorid wurde nach Michaelis und

Schulze (1893) zuerst dargestellt. 45 g Bariumhydroxyd wurden in 300 ccm Wasser suspendiert, und unter starkem Abkühlen wurden darin portionsweise 15 g Dichlorid gelöst. Das überschüssige Barium entfernte man mittels Kohlensäure. Aus der filtrierten Lösung war das Bariumsalz des Phosphorsäure-Monoanilids durch Zusatz des gleichen Volumens Alkohol auszuscheiden. Das Bariumsalz wurde weiter durch Umfällen mit Alkohol aus seiner wässrigen Lösung von dem anhaftenden Bariumchlorid befreit. Es bildete blättchenförmige Kristalle und war löslich in Wasser, aber nicht in Alkohol. Ausbeute 5,8 g. Das Bariumsalz ergab die folgende Analyse:

<i>Analyse:</i>	berechnet P	10.04%,
	gefunden P	9.98%.

F. Phosphorsäure-Mono-p-Chloranilid.

Dies wurde nach Otto (1895) über das Phosphorsäure-p-Chloranilid-Dichlorid hergestellt. Das aus verdünntem Alkohol umkristallisierte Phosphorsäure-Mono-p-Chloranilid bestand aus seidenglänzenden Nadeln von F. 150°. Ausbeute 2 g aus 15 g Dichlorid.

<i>Analyse:</i>	berechnet P	14.98%,
	gefunden P	14.99%.

II. DARSTELLUNG DER FERMENTLÖSUNGEN.

A. Das Nierenferment nach Asakawa (1928).

B. Das Reiskleienferment nach Uzawa (1932), aber ohne Reinigung durch die Adsorptionsmethode.

C. Das gereinigte Takaferment nach Kobayashi (1927). Die Fermentlösungen wurden alle bis zur Freiheit von anorganischem Phosphor gegen destilliertes Wasser dialysiert.

III. ANORDNUNG DER FERMENTVERSUCHE.

M/100 Substratlösung wurde jedesmal frisch bereitet. Wie oben erwähnt, sind alle Substrate labil und zersetzen sich durch

die katalytische Wirkung der Wasserstoffionen. Darum wurden bei der Herstellung der Lösungen die Substrate mit den freien Säuregruppen vorher mit äquivalenter Natronlauge neutralisiert. Die Zusammensetzung der Versuchslösungen war wie folgt:

a) *Hauptversuch.*

<i>M</i> /100	Substratlösung	10 ccm
	Fermentlösung	5 „
	Puffer	5 „
	Wasser	5 „

b) *Kontrollversuch.*

<i>M</i> /100	Substratlösung	10 ccm
	Puffer	5 „
	Wasser	10 „

Versuchstemperatur 37°. Die Substratlösung wurde bei beiden Versuchsreihen zuletzt versetzt. Als Pufferlösungen dienten *M*/2 Essigsäure-Acetat, *M*/10 Glykokoll-Salzsäure und *M*/10 Glykokoll-Natronlauge. PH elektrometrisch gleich nach Vermischen mit der Substratlösung. Nach einer Stunde wurden 5 ccm Versuchslösung in ein Zentrifugierglas einpipettiert und mit dem gleichen Volumen Magnesiummischung versetzt. Nach einer Stunde wurde der Niederschlag zentrifugiert, mit einem Gemisch aus 3 Teilen Wasser und 1 Teile konzentriertem Ammoniak zwei mal, dann mit 75%igem Alkohol, der 10 ccm konzentriertes Ammoniak pro Liter enthielt, einmal gewaschen und getrocknet. Das so erhaltene Magnesiumammoniumphosphat wurde mit 5 ccm 10%iger Trichloressigsäure quantitativ in einen 10 ccm Messzylinder eingewaschen, und man bestimmte den anorganischen Phosphor kolorimetrisch nach Fiske und Subbarow. In den folgenden Protokollen der Fermentversuche wird der gefundene Phosphor in mg für 1 ccm Versuchslösung berechnet angegeben. Die Endkonzentration der Substrate in den Versuchslösungen ist überall *M*/250. 100%ige Hydrolyse soll also 0.124 mg P liefern. Daraus wurde das hydrolytische Prozent berechnet und auch in den Protokollen angegeben.

IV. ERGEBNISSE DER FERMENTVERSUCHE.

1. Phosphorsäure-Monoamid.

a) Nierenferment.

PH	Nach 1 Stunde.					
	Hauptversuch(H)		Kontrollversuch(K)		(H)-(K)	
	P in mg	%	P in mg	%	P in mg	%
1.89	0.07187	57.96	0.06814	55.60	0.00373	2.36
2.64	0.07340	59.20	0.04910	39.60	0.02430	19.60
3.31	0.08096	65.29	0.03650	29.46	0.04446	35.83
3.98	0.07175	57.86	0.02910	23.41	0.04265	34.45
4.84	0.06556	52.87	0.02340	18.85	0.04216	34.02
6.09	0.06410	51.67	0.01650	14.14	0.04760	37.53
6.89	0.06314	50.92	0.01260	10.21	0.05054	40.71
7.98	0.05724	46.16	0.00650	5.60	0.05074	40.56
9.06	0.06306	50.85	Spur	0	0.06306	50.85
9.96	Spur	0	0	0	0	0

b) Kleienferment.

PH	Nach 1 Stunde.					
	Hauptversuch(H)		Kontrollversuch(K)		(H)-(K)	
	P in mg	%	P in mg	%	P in mg	%
1.71	0.07610	61.34	0.0744	60.00	0.00170	1.34
2.46	0.08270	66.72	0.0604	48.69	0.02230	18.03
3.24	0.08923	71.96	0.0391	31.50	0.05013	40.46
3.93	0.09510	76.69	0.0334	26.91	0.06170	49.78
4.82	0.09667	77.96	0.0235	10.00	0.07317	58.96
5.52	0.09828	79.26	0.0204	16.43	0.07788	62.83
6.09	0.06974	56.24	0.0165	14.14	0.05324	42.10
6.89	0.06145	49.56	0.0120	9.74	0.04945	39.82
7.98	0.05857	47.56	0.0051	4.10	0.05347	43.46
8.72	0.05670	45.74	0	0	0.05670	45.74
10.00	0	0	0	0	0	0

c) Takaferment.

PH	Nach 1 Stunde.					
	Hauptversuch(H)		Kontrollversuch(K)		(H)-(K)	
	P in mg	%	P in mg	%	P in mg	%
1.48	0.08215	66.25	0.07812	63.00	0.00403	3.25
1.83	0.08260	66.61	0.06330	59.09	0.01930	7.52
3.20	0.09960	80.30	0.03720	29.98	0.06240	50.32
4.39	0.08030	64.78	0.02910	23.47	0.05120	41.31
5.45	0.07900	63.72	0.02370	19.07	0.05530	44.65
6.09	0.07723	62.29	0.01650	14.14	0.06073	48.15
7.54	0.03340	27.31	0.00740	5.94	0.02650	21.37
7.80	0.03370	27.16	0.00710	5.68	0.02660	21.48
9.08	0.00260	20.90	0	0	0.00260	20.90
10.15	0	0	0	0	0	0

2. Phosphorsäure-Diamid.

a) Nierenferment.

PH	Nach 1 Stunde.					
	Hauptversuch(H)		Kontrollversuch(K)		(H)-(K)	
	P in mg	%	P in mg	%	P in mg	%
1.48	0.05010	40.37	0.04180	33.71	0.00830	6.66
2.10	0.05390	43.48	0.03230	26.03	0.02160	17.45
3.10	0.07180	57.98	0.02710	21.87	0.04470	36.12
4.03	0.06280	50.59	0.02116	17.06	0.04164	33.53
5.00	0.05660	45.67	0.01980	15.96	0.03780	29.71
5.98	0.05280	42.58	0.01780	14.35	0.03500	28.23
7.63	0.04060	32.74	0.01600	12.90	0.02460	19.84
8.49	0.03500	28.24	0.00740	6.04	0.02760	22.20
9.01	0.02880	23.24	0	0	0.02880	23.24
10.00	0.00500	4.03	0	0	0.00500	4.03

b) Kleienferment.

P _H	Nach 1 Stunde.					
	Hauptversuch (H)		Kontrollversuch (K)		(H) - (K)	
	P in mg	%	P in mg	%	P in mg	%
1.71	0.0386	31.16	0.03619	29.19	0.00241	1.97
2.07	0.0421	33.95	0.03580	28.90	0.00630	5.05
3.05	0.0474	38.25	0.02840	22.96	0.01900	15.29
3.76	0.0554	44.79	0.02420	19.50	0.03120	25.29
4.80	0.0578	46.74	0.02010	16.20	0.03770	30.54
5.60	0.0506	40.82	0.01980	16.00	0.03080	24.82
5.80	0.0502	40.50	0.01920	15.50	0.03100	25.00
7.60	0.0200	16.12	0.01570	12.70	0.00430	3.42
8.16	0.0153	12.30	0.01240	10.00	0.00290	2.30
9.01	0	0	0	0	0	0

c) Takaferment.

P _H	Nach 1 Stunde.					
	Hauptversuch (H)		Kontrollversuch (K)		(H) - (K)	
	P in mg	%	P in mg	%	P in mg	%
1.60	0.04360	35.17	0.0379	30.59	0.00570	4.58
2.51	0.07500	60.48	0.0304	24.56	0.04460	35.92
3.07	0.08060	65.06	0.0274	22.09	0.05320	42.97
3.94	0.08102	65.33	0.0246	19.85	0.05642	45.48
4.93	0.06400	51.61	0.0212	17.19	0.04280	34.42
5.98	0.06270	50.61	0.0213	15.81	0.04140	34.80
7.60	0.02980	24.04	0.0196	12.35	0.01020	11.69
8.16	0.01760	14.20	0.0153	10.60	0.00230	3.60
9.01	Spur	0	0	0	0	0
10.00	0	0	0	0	0	0

3. Phenylphosphorsäure-Monoamid.

a) Nierenferment.

PH	1 Stunde		3 Stunden		24 Stunden			
	Hauptversuch		Hauptversuch		Hauptversuch		Kontrollversuch	
	P in mg	%	P in mg	%	P in mg	%	P in mg	%
1.70	0	0	0	0	0	0	0	0
2.15	0.0088	7.16	0.0262	21.14	0.09056	73.03	0	0
3.07	0.0076	6.14	0.0152	12.22	0.05500	44.37	0	0
3.80	Spur	Spur	0.0082	6.63	0.02950	23.84	0	0
4.60	Spur	Spur	0.0077	6.25	0.02500	20.16	0	0
5.81	Spur	Spur	0.0061	4.98	0.02300	18.87	0	0
6.63	Spur	Spur	0.0048	3.85	0.01180	9.50	0	0
8.00	0	0	Spur	Spur	0.00960	7.74	0	0
9.00	0	0	Spur	Spur	0.00720	5.81	0	0
10.00	0	0	Spur	Spur	0.00620	5.00	0	0

b) Kleienferment.

PH	1 Stunde		3 Stunden		24 Stunden			
	Hauptversuch		Hauptversuch		Hauptversuch		Kontrollversuch	
	P in mg	%	P in mg	%	P in mg	%	P in mg	%
1.58	0	0	0	0	Spur	Spur	0	0
2.34	Spur	Spur	0.00662	5.34	0.0339	27.32	0	0
2.75	0.0096	7.77	0.01770	14.29	0.0874	70.48	0	0
2.99	0.0117	9.46	0.02350	18.93	0.0876	70.64	0	0
3.86	0.0113	9.12	0.02080	16.75	0.0760	61.25	0	0
4.93	0.0096	7.74	0.01560	12.56	0.0526	42.45	0	0
5.81	0.0066	5.32	0.01200	9.83	0.0436	35.10	0	0
6.58	0.0050	4.09	0.00830	7.03	0.0296	23.90	0	0
7.60	Spur	Spur	0.00460	3.77	0.0194	15.70	0	0
8.97	0	0	0	0	0	0	0	0

c) Takaferment.

PH	1 Stunde		3 Stunden		24 Stunden			
	Hauptversuch		Hauptversuch		Hauptversuch		Kontrollversuch	
	P in mg	%	P in mg	%	P in mg	%	P in mg	%
1.70	0	0	0	0	0	0	0	0
2.15	0.02390	19.32	0.0713	57.53	0.1032	83.22	0	0
3.07	0.00816	6.58	0.0156	12.59	0.0570	45.93	0	0
3.80	Spur	Spur	0.0048	3.90	0.0204	16.48	0	0
4.80	Spur	Spur	0.0033	2.89	0.0074	5.96	0	0
5.81	Spur	Spur	0.0032	2.58	0.0050	4.03	0	0
7.41	0	0	0	0	0	0	0	0
8.00	0	0	0	0	0	0	0	0
9.00	0	0	0	0	0	0	0	0
10.00	5	0	0	0	0	0	0	0

4. 5. Phosphorsäure-Monoanilid und
Phenylphosphorsäure-Monoanilid.

Sie verhalten sich fermentativ in ganz gleicher Weise wie die entsprechenden Monoamide. Um Raum zu sparen, verzichten wir darauf, die einzelnen Data anzugeben.

6. Phosphorsäure-Mono-p-Chloranilid.

a) Nierenferment.

PH	Nach 1 Stunde					
	Hauptversuch (H)		Kontrollversuch (K)		(H) - (K)	
	P in mg	%	P in mg	%	P in mg	%
0.85	0.04440	35.83	0.04054	32.70	0.00386	3.13
1.60	0.03176	25.61	0.02000	16.13	0.01176	9.48
1.80	0.03899	31.45	0.01295	10.45	0.02604	21.00
2.01	0.03658	29.50	0.00893	7.20	0.02765	22.30
2.56	0.03257	26.27	0.00707	5.70	0.02550	20.57
2.89	0.03020	24.35	0.00530	4.29	0.02490	20.06
3.28	0.02110	17.00	Spur	Spur	0.02110	17.00
4.65	0.02000	16.13	Spur	Spur	0.02000	16.13
5.42	0.01720	13.87	0	0	0.01720	13.87
7.10	0	0	0	0	0	0
8.36	0	0	0	0	0	0
9.59	0	0	0	0	0	0
10.00	0	0	0	0	0	0

b) Kleienferment.

PH	Nach 1 Stunde					
	Hauptversuch (H)		Kontrollversuch (K)		(H) (K)	
	P in mg	%	P in mg	%	P in mg	%
0.84	0.04026	32.47	0.0375	30.27	0.00276	2.20
2.09	0.02372	20.75	0.0186	15.00	0.00712	5.75
2.58	0.02270	18.31	0.0077	6.25	0.01500	12.06
3.91	0.03200	25.75	Spur	Spur	0.03200	25.75
4.51	0.04000	32.26	0	0	0.04000	32.26
5.74	0.01780	14.35	0	0	0.01780	14.35
6.49	0.01260	10.14	0	0	0.01260	10.14
7.54	0	0	0	0	0	0
8.93	0	0	0	0	0	0
9.87	0	0	0	0	0	0

c) Takaferment.

PH	Nach 1 Stunde					
	Hauptversuch (H)		Kontrollversuch (K)		(H) (K)	
	P in mg	%	P in mg	%	P in mg	%
1.04	0.03950	31.85	0.03750	30.27	0.00200	1.58
1.92	0.05950	48.00	0.01860	15.00	0.04090	33.00
2.67	0.04440	35.83	0.00774	6.25	0.03666	29.58
3.60	0.03380	27.22	Spur	Spur	0.03380	27.22
4.82	0.01714	13.82	0	0	0.01714	13.83
5.79	0.01660	13.40	0	0	0.01660	13.40
6.51	0	0	0	0	0	0
7.50	0	0	0	0	0	0
8.78	0	0	0	0	0	0
9.94	0	0	0	0	0	0

V. VERSUCH ÜBER DEN HYDROLYSENMECHANISMUS DES PHENYLPHOSPHORSÄUREAMIDS.

A. Spontane Desamidierung in saurer Reaktion.

Zur Feststellung der spontanen Desamidierung wurde die

Lösung des Amids bei PH 1 und 2 24 Stunden im Brutschrank von 37° stehen gelassen. Die Lösungen bestanden aus:

<i>M</i> /10 Glykokoll-HCl	5 ccm
Wasser	10 „
<i>M</i> /100 Amidlösung	10 „

Nach 24 Stunden wurde die Reaktion auf PH 9 umgestellt. Die zuzusetzende Alkalimenge war die Summe des mit der Salzsäure in Glykokollpuffer gleichen Volumens eingebrachten *M*/10 NaOH und derjenigen Menge *M*/10 NaOH, die mit dem vorhandenen Glykokoll das Puffergemisch von PH 9 darstellen sollte. Die Lösungen wurden dann weiter durch Wasserzusatz auf 35 ccm gebracht, mit 5 ccm Nierenferment versetzt und in ein Wasserbad von 37° eingetaucht. PH elektrometrisch. P-Bestimmung wie früher. Die Endkonzentration des Substrats war *M*/400. 100%ige Hydrolyse soll also 0.0775 mg für 1 ccm Lösung liefern.

TABELLE A.

PH bei		Nach 1 Stde.		Nach 3 Stdn.	
Spontanhydrolyse	Fermentwirkung	P in mg	%	P in mg	%
1	8.9	0.02080	26.89	0.07420	95.86
2	8.9	0.01946	25.11	0.07013	90.49

Wie man aus diesem Ergebnis (Tabelle A) ersehen kann, ist das Phenylphosphorsäureamid während des 24 stündigen Aufenthalts im Brutschrank bei PH 1 oder 2 zum grössten Teil spontan desamidiert worden. Es lieferte aber ohne Fermentzusatz bei PH 1 oder 2 selbst nach 24 Stunden keinen anorganischen Phosphor. Die nachher auf PH 9 alkalisierte Lösung zeigte auch, falls sie ohne Fermentzusatz bei 37° gehalten wurde, nach 3 Stunden keine Reaktion des anorganischen P.

Dasselbe Resultat wurde mit dem Phenylphosphorsäure-Anilid erhalten (Tabelle B).

TABELLE B.

PH bei		Nach 1 Stde.		Nach 3 Stdn.	
Spontan- hydrolyse	Ferment- wirkung	P in mg	%	P in mg	%
1	8.9	0.01550	19.75	0.03930	50.72
2	8.5	0.00953	12.30	0.02444	31.54

*B. Wirkung des Habu-Gifts auf das
Phenylphosphorsäure-Monoamid.*

Der Versuch wurde wie folgt angesetzt:

M/100 Substratlösung	10 ccm	} 37°
0.2%ige Giftlösung	5 "	
Puffer	5 "	
Wasser	5 "	

Nach 24 Stunden wurde das anorganische Phosphat mit Magnesiummischung gefällt und, wie oben erwähnt, kolorimetrisch bestimmt. Das Resultat wird in Tabelle C angegeben.

TABELLE C.

PH	P in mg	%
2	0	0
3	0	0
9	0.0223	18

VI. TRENNUNG DER PHOSPHAMIDASE UND PHOSPHOESTERASE.

*A. Gewinnung der Phosphamidase frei von
Phosphoesterase.*

60 ccm Nierenfermentlösung, 14.76 ccm M/2 Essigsäure und 0.24 ccm M/2 Acetat wurden mit 6 g Kaolin bei 37° 1 Stunde unter bisweiligem Umschütteln stehen gelassen. Nach Zentrifugieren dialysierte man die Adsorptionsrestlösung über Nacht gegen destilliertes Wasser. Bei der Prüfung der dargestellten Fermentlösung war der Versuchsansatz in gleicher Weise zusammengesetzt,

wie oben bei der allgemeinen Anordnung der Fermentversuche angegeben. Die Endkonzentration der Substrate war also $M/250$. Kontrollversuche mit Wasser statt Fermentlösung wurden parallel ausgeführt. Phosphorbestimmung nach einer Stunde.

Substrate	PH	Hauptversuch (H)		Kontrollversuch (K)		(H) - (K)
		P in mg	%	P in mg	%	
Glycero-phosphorsäure	2.95	0	0	0	0	0
	4.65	0	0	0	0	0
	8.92	0	0	0	0	0
Phosphorsäure-monoamid	9.06	0.0256	20.80	Spur	0	20.80
Phosphorsäure-diamid	3.16	0.0379	30.56	0.0271	21.80	8.76
Phosphorsäure-anilid	4.84	0.0500	40.34	0.0405	32.66	7.68
	8.90	0.0185	14.95	0.0119	9.67	5.28
Phosphorsäure-p-Chloranilid	4.68	0.00912	7.35	Spur	0	7.35

Die esterasefreie Phosphamidaselösung konnte auch erhalten werden, indem bei dem oben erwähnten Adsorptionsverfahren statt 6 g Kaolin 12 ccm Tonerde-C_v-Suspension gebraucht wurden. Ein 1 stündiger Versuch mit der dargestellten Fermentlösung ergab folgendes:

Substrate	PH	P in mg	%
Glycerophosphat	8.7	0	0
Phosphorsäureamid	8.7	0.0278*	22.4

* Der Kontrollversuch lieferte nur eine Spur von P.

B. Gewinnung der Phosphoesterase frei von Phosphamidase.

10 ccm Nierenfermentlösung und 5 ccm $M/10$ Na_2HPO_4 wurden mit 2,5 ccm rötlichem Eisenhydroxydgel bei 37° behandelt.

Nach einer Stunde wurde die Lösung zentrifugiert und nochmals eine Stunde mit 2,5 ccm Eisenhydroxydgel stehen gelassen. Dann wurde die Adsorptionsrestlösung gegen destilliertes Wasser bis zur P-Freiheit dialysiert. Prüfung der Fermentlösung in gleicher Weise wie oben. Ein 1 stündiger Versuch ergab das folgende Resultat:

Versuch	Substrate	PH	Hauptversuch (H)		Kontrollversuch (K)		
			P in mg	%	P in mg	%	(H) - (K)
No. 1	Phosphorsäure-anilid	9	0.01202	9.7	0.01202	9.7	0
	Glycero-phosphorsäure	9	0.01180	9.5	0	0	9.5
Nr. 2	Phosphorsäure-monoamid	9	Spur	0	Spur	0	0
	Glycero-phosphorsäure	9	0.01180	9.5	0	0	0

LITERATURE.

- Asakawa, K. (1928): J. of Biochem., **10**, 157.
 Kobayashi, H. (1927): J. of Biochem., **8**, 205.
 Michaelis, A. (1903): Ann. d. Chemie., **326**, 224.
 Michaelis, A. u. Schulze, G. (1893): Ber. d. deut. chem. Ges., **26**, 2939.
 Otto, P. (1895): Ber. d. deut. chem. Ges., **28**, 617.
 Stokes, H. N. (1894): Amer. chem. Journ., **15**, 198.
 Takahashi, H. (1932): J. of Biochem., **16**, 447 und 463.
 Uzawa, S. (1932): J. of Biochem., **15**, 1 und 19.

THE "NON-SOLVENT SPACE" OF THE SERUM AND THE CHLORINE BOUND BY THE SERUM PROTEIN.

By

ATUSI HAYASIDA.

*(From the 1st Division of the Institute of Physiology, Kyoto
Imperial University. Director: Prof. Dr. R. Shoji.)*

(Received for publication, May 2, 1933.)

INTRODUCTION.

There are two kinds of concentration with regard to a crystalloid dissolved in a protein solution. One is the true concentration in the free water of the solution, while the other is the total concentration with reference to its whole volume. The difference between these two kinds of concentration may be influenced by the adsorption, whether positive or negative, of the crystalloid on particles of protein. When the adsorption is negligible, the true concentration in the free water space is higher than the total concentration with reference to the whole volume. In this case, the sum of the space occupied by the protein molecules and the hydration space surrounding them appears as the "non-solvent space". When the adsorption is considerable, it is not certain that the true concentration is higher than the total concentration, and the non-solvent space is not equal to the sum of the molecular volume and its hydration space.

The idea of the non-solvent space was first proposed by Geffcken in connection with solution of gases in a colloidal solution, and was later confirmed by several investigators. Rona studied it in connection with the blood serum by his compensation dialysis; Polányi did the same by conductivity measurement, and Ruzsnyák by ultra-filtration. Augsberger, Weber and Nachmannsohn, and also Oda, estimated it by both ultra-filtration and compensation dialysis. Recently Versmold employed for

this purpose the estimation of the depression of the freezing point and criticized the studies mentioned above.

The chlorine content of the blood plasma or of the serum has an intimate connection with its non-solvent space. Rona concluded from his compensation dialysis experiments that the whole of the chloride of the serum existed in a free diffusible form, and never chemically bound to proteins. Falta and Richter-Quittner supported Rona's view on the serum, but not on the plasma. According to his analytical estimations, 10%-20% of the chloride may be bound to fibrinogen, not by adsorption but fixed chemically. On the other hand, Rusznyák concluded from his ultra-filtration experiments that there was no colloiddally bound chloride in the blood. Katsu, and his pupils, Itoh, and Akagi, maintained from their electrode potential measurements and their conductivity estimations, that a certain portion of the chloride combines by adsorption with glycocoll, egg-albumin, or serum-albumin in a solution, or with serum-proteins in blood.

The present study was undertaken in an attempt to estimate the non-solvent space of the blood serum by means of the chlorine determination. Its true concentration was estimated by potentiometry with a silver chloride electrode immersed in the serum. The measurement gives the activity of the chlorine ion, (Cl') , in mol unit. This being divided by the corresponding activity coefficient, α , $(Cl')/\alpha$ gives the true concentration of the chlorine ion in the free water of the serum. On the other hand, the total concentration of the chloride with reference to the whole volume, $[Cl]$, was estimated by the analytical method.

Now, the non-solvent space is taken as x , where the whole volume is unity, and the amount of chloride bound in any way as y ; then we have

$$\frac{[Cl]-y}{1-x} = \frac{(Cl')}{\alpha} \dots\dots\dots (a)$$

The studies of Rona, Falta and Richter-Quittner, Rusznyák etc. mentioned above did not give the value of y . Itoh, one of Prof. Katsu's pupils, maintained it to be practically nil. If we put $y=0$ in the above equation, we have

$$x = \frac{(Cl')/\alpha - [Cl]}{(Cl')/\alpha} \dots\dots\dots (b)$$

which agrees with Versmold's assumption,

$$\text{non-solvent space} = \frac{c_e - c_g}{c_g}$$

where c_e and c_g represent the true and the total concentration respectively.

According to our opinion, however, it has not yet been verified undoubtedly that $y=0$, so we have tried to find out the values of both x and y experimentally. For this purpose, KCl was dissolved in various concentrations in a series of vessels containing the same serum, and (Cl') as well as $[Cl]$ were estimated with regard to each solution, and thus a series of numerical equations of the form (a) were obtained. It being assumed that x , as well as y , is respectively the same for the same series, their values were computed from two equations chosen arbitrarily. If this assumption is admissible, x and y obtained from all possible sets of each two equations will agree satisfactorily. This was confirmed to be the case by our experiments.

EXPERIMENTAL METHODS.

A. *Materials.*

Serum was prepared by defibrinating horse blood by stirring it up with a feather. Any material which contained detectable hemoglobin was discarded.

The KCl used in this research was Kahlbaum's crystals "Zur Analyse mit Garantieschein."

Distilled water was prepared with a tin cooler, and tested for its Cl-content, the average of which was found to be $pCl' 4.92 \pm 0.012$. Such a minute amount is quite negligible in comparison with that of the serum, where $pCl' < 1$.

B. *Measurement of the total chloride content.*

This measurement of the total chloride content was accomplished by Volhard's method. To 2.00 cc. of the serum is added

an excess of 0.05 *N* AgNO₃ solution and also 10 cc. of HNO₃ solution (sp. w. 1.42), and it is heated for ca. 30 minutes on a small flame. After the liquid becomes transparent, a saturated solution of *K*-permanganate is added to it drop by drop, until the colour of the last drop does not disappear. The last coloration is caused to disappear by addition of glucose. Then the excess of AgNO₃ is titrated with a 0.05 *N* NH₄SCN solution, a saturated solution of iron alum being used as the indicator. The total chloride content of the sample is then calculated as usual. It is hardly necessary to say that all the reagents should be tested for adulteration with chloride. The AgNO₃ solution is standardised with a 0.05 *N* KCl solution.

C. Potentiometric measurement of the chlorine ion activity.

The method of estimating the chlorine ion activity by potentiometric measurement of the AgCl-electrode carried out in our Institute has already been reported by Katsu. Only one point need be described here.

As the electrode vessel, we preferred a 1 cc. glass injection syringe. On the top of its hollow plunger was sealed a platinum wire, which was fused to a leading wire inside the plunger. The outer part of the platinum wire was silver-plated by electrolysis, and then it was chloridised: it therefore served as a reversible chloride electrode.

As the other half-cell, a 3.5 *N* KCl-calomel electrode was adopted, of which the electrode potential had been stabilised for more than 1 year, and the cell was composed according to rule, with a 3.5 *N* KCl solution as the junction medium.

D. Calculation of the Cl-ion activity, (Cl').

On applying equation (a), namely

$$\frac{[\text{Cl}] - y}{1 - x} = \frac{(\text{Cl}')}{\alpha},$$

we meet with a difficulty with regard to the activity coefficient, α .

(Cl') is calculated by

$$-\log (\text{Cl}') = \frac{E_0 - E}{A} \dots\dots\dots (\text{c})$$

$$(A = 0.0001983T = 0.05773 \text{ at } 18^\circ\text{C}),$$

where E is the e.m.f. of the cell,



and E_0 the normal electrode potential of it. The latter is estimated by applying a standard solution of a known (Cl') as the electrode solution in the above-mentioned cell. Suppose we find the e.m.f. of such a cell of a known (Cl')₁ as E_1 then we have

$$E_0 = E_1 - A \log (\text{Cl}')_1 \dots\dots\dots (\text{d})$$

For this purpose, we adopted a 0.01N KCl solution, and obtained the value,

$$E_1 = 0.09268 \pm 0.00003 \text{ volt},$$

as the mean of 12 parallel estimations with one and the same calomel electrode. Now the (Cl')₁ of the 0.01N KCl solution is calculated by:

$$(\text{Cl}')_1 = 0.01 \times \alpha_1$$

where α_1 is the activity coefficient of KCl in this concentration. There are, however, two kinds of activity coefficient, namely Ghosh's α and that of Debye-Hückel. The following data are obtained with them at 18°C.

	after Ghosh	after Debye-Hückel
(Cl)=0.01 α	0.009226	0.008917
E_0 for our calomel electrode, No. 1	0.02480 ± 0.00003	0.02566 ± 0.00003
E_0 corrected for diffusion potential, e.	0.02387	0.02500

According to Katsu, the applicability of both the Ghosh equation and the Debye one for a KCl solution is unsatisfactory, but, when a suitable correction is introduced into the mean ionic

distance in the two activity equations, the values of E_0 computed from these equations approach each other closely, and their applicability to the KCl solution becomes satisfactory. Thus we see that neither the original Ghosh theory nor the Debye-Hückel one is strictly correct. There are other data for α , corrected by Hückel, but they also include arbitrary assumptions somewhere in the theory, so that they can not be regarded as absolutely correct either.

The diffusion potential, e , established between two electrode liquids, enters into E_0 as a correction term, as is seen in the above table. This also, varies somewhat according to the activity theory adopted. If the concentrations of the two liquids are c_1 and c_2 , the diffusion potential, e , is given by the well-known Nernst equation,

$$e = 0.05773 \frac{v-u}{v+u} \log \frac{\alpha_1 c_1}{\alpha_2 c_2}$$

at 18°C.

Here again the activity theory, since it entails the activity coefficients α_1 and α_2 , comes into consideration. Thus we computed the following data according to Ghosh's as well as Debye's theory.

c_1	c_2	e (Ghosh)	e (Debye)
3.5	0.2	0.00044 volt	0.00022 volt
"	0.1	0.00054	0.00031
"	0.05	0.00066	0.00041
"	0.02	0.00082	0.00055
"	0.01	0.00093	0.00066

Thus the value of E_0 depends upon which activity theory we adopt.

In order to avoid this ambiguity we preferred the following procedure :

Suppose a cell as mentioned above is made with a KCl solution of a known concentration, c , of which the real e.m.f., E , is represented by

$$E = E_0 + A \log a + A \log c$$

If the measured e.m.f. is E' , and its diffusion potential neglected, then it will include an error, e , so that

$$E = E' + e.$$

On the other hand, E_0' being the E_0 according to any one of the activity theories mentioned above, e.g. the Ghosh one, it contains an error e_0 , so that

$$E_0 = E_0' + e_0.$$

Thus we have

$$E' + e = E_0' + e_0 + A \log a + A \log c.$$

e_0 is a constant, while e varies according to the concentration, c .

Putting

$$A \log a + e_0 - e = A \log a',$$

we have

$$E' = E_0' + A \log a' + A \log c,$$

where a' loses its physical meaning, and remains merely as a function of c .

Now, preparing a series of such cells in various concentrations, and measuring the E' for each cell we can compute the corresponding $\log a'$, each of which can then be plotted against the corresponding E' or $\log c$. On such a curve we can find the a' corresponding to any concentration at will by interpolation. We carried out this measurement with a series of KCl solutions of from $0.2N$ to $0.00625N$ in successive two-fold dilution, assuming $E_0' = 0.02480$ after Ghosh's theory. The results are given in Table I. For practical purposes, we plotted a' against pCl' .

Now a similar cell is prepared with a liquid to be tested, and its E' , as well as the corresponding a' are obtained as above. Then, applying the equation for them, we have

$$E' = E_0' + A \log a' + A \log c$$

where we take the same E_0' as above, and we can compute the concentration of the chlorine, which applies under the assumption that it exists as KCl. The fact is that the chlorine in a serum exists in most part as NaCl, and not as KCl, so that the diffusion potential

deviates theoretically somewhat from that of a KCl solution. In practice, however, this deviation is very slight and quite negligible. In experimental cases, however, where some chloride was to be dissolved in a serum, we used KCl, and not NaCl, to avoid this deviation.

RESULTS AND DISCUSSIONS.

A. Concentration experiments.

Several amounts of KCl were dissolved in a series of vessels containing the same serum, in proportions of less than 5 g per L. The original serum contained about 0.1N chloride, so that a series of solutions was prepared, of which the total chloride concentration varied from about 0.1N to about 0.17N. Of these solutions, the total chloride content, [Cl], the chlorine ion activity, (Cl'), and also the corresponding activity coefficient, α , were determined as described above. We thus obtained a series of equations (a), namely,

$$[\text{Cl}] - y = \frac{(\text{Cl}')}{\alpha} (1 - x).$$

Now, solving any two of these equations we can compute the values of x and y . Table II is an example. Here we estimated 4 solutions No. 1-4, and obtained 4 equations.

	$[\text{Cl}] - y = \frac{(\text{Cl}')}{\alpha} (1 - x)$
No. 1	$0.1063 - y = 0.1260 \cdot (1 - x)$
No. 2	$0.1228 - y = 0.1478 \cdot (1 - x)$
No. 3	$0.1391 - y = 0.1680 \cdot (1 - x)$
No. 4	$0.1734 - y = 0.2105 \cdot (1 - x)$

From these equations, 6 combinations of any two are possible, from which x and y are found as follows.

It is reasonable to neglect the increase in the volume of the serum caused by dissolving such small quantities of KCl. On the other hand, it is not certain that x and y are not influenced by dissolving

	x	y
No. 1 and No. 2	0.243	0.0109
No. 1 and No. 3	0.219	0.0078
No. 1 and No. 4	0.206	0.0063
No. 2 and No. 3	0.193	0.0035
No. 2 and No. 4	0.193	0.0035
No. 3 and No. 4	0.193	0.0035
mean	0.2078	0.00592

the salt. On examining the above examples, however, we see that x and y are not influenced by the increasing of the concentration, but remain practically constant, except those computed from No. 1 and others. No. 1 may be regarded as a rather erroneous figure. In other words, the non-solvent space of the serum, and the chloride bound to the serum protein are practically not influenced by the solution of KCl in it in an amount of less than 5 g per L. Thus the present method of computing x and y is proved applicable.

Another example, which is given in Table III, gives similar results. Here we obtained 3 equations,

	$[\text{Cl}] - y = \frac{(\text{Cl}')}{\alpha} \cdot (1 - x)$
No. 1	$0.1046 - y = 0.1263 \cdot (1 - x)$
No. 2	$0.1184 - y = 0.1433 \cdot (1 - x)$
No. 3	$0.1586 - y = 0.1954 \cdot (1 - x)$

and 3 solutions of x and y ,

	x	y
No. 1 and No. 2	0.188	0.0020
No. 1 and No. 3	0.219	0.0060
No. 2 and No. 3	0.228	0.0078
mean	0.212	0.00527

which give similar values of x and y to the former example. From all of them we find their mean values,

$$x = 0.209 \pm 0.004$$

$$\text{and } y = 0.0057 \pm 0.0006,$$

or in words, the non-solvent space of the blood serum amounts to about 20% of its whole volume, while the chloride bound to its protein molecules is only about 0.006 *M*, which is practically negligible when compared with its total amount, 0.1–0.17 *M*. The latter conclusion agrees with that of Itoh, who maintained that the whole of the chloride in the serum exists practically free.

B. Dilution experiments.

The serum was diluted 2×, 4×, and 8× with distilled water successively, so that solutions 1/2, 1/4, and 1/8 of the concentration of the original serum were prepared, and their total chloride contents as well as their Cl-ion activities were estimated. See Table IV. Assuming that $y=0.0057$, which was obtained by the above experiment, is also applicable to the original serum in this case, and 0.00285 to the 1/2 concentrated serum, 0.001425 to the 1/4 concentrated one, and 0.0007125 to the 1/8 concentrated one, we computed x for each case, representing it as x_1 , x_2 , x_3 , and x_4 respectively. If the actual volume of the non-solvent space, x is not influenced by dilution, x_1 , x_2 , x_3 and x_4 should be equal to $x_1/1$, $x_1/2$, $x_1/4$, and $x_1/8$ respectively. In practice, however, we found that this is not the case, but that the ratio $x_n : x_1/2^{n-1}$ increases markedly with proceeding dilution.

Similar dilution experiments were repeated with 0.02 *N*, 0.05 *N* and also 0.1 *N* KCl solutions (Tables V, VI, and VII), and the following results were obtained.

Dilution	$x_n : x_1/2^{n-1}$ when diluted with							
	H ₂ O		0.02 <i>N</i> KCl		0.05 <i>N</i> KCl		0.1 <i>N</i> KCl	
	I	II	I	II	I	II	I	II
original	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
2×	1.74	1.78	1.63	1.58	1.51	1.35	1.30	1.35
4×	3.08	3.06	2.28	2.05	2.18	2.12	1.56	1.62
8×	5.15	5.91	2.48	2.74	1.48	1.73	1.52	1.89

These results show that, when the serum is diluted with a KCl solution of greater concentration, the increase of x with dilution is less marked than when the serum is diluted with a less con-

centrated solution. This agrees somewhat with the statement made by Oda, who maintained that the non-solvent space of the serum with regard to glucose decreases with the addition of a salt (0.5N KSCN). Again, we see from our results that the non-solvent space can not be estimated by diluting the serum, so that Polányi's experiments are not reliable, as was stated by Weber and Versmold.

Now we are faced with the question of why the ratio $x_n : x_1/2^{n-1}$ increases so markedly on dilution. This far exceeds the scope of experimental error. If we assume $y=0$, the ratio shows almost the same relation, which may be seen in the following example, calculated from Table IV, a.

Dilution with H ₂ O	taking y into calc.		assuming y = 0	
	x	$x_n : x_1/2^{n-1}$	x	$x_n : x_1/2^{n-1}$
original	0.261	1.00	0.219	1.00
2×	0.227	1.74	0.182	1.66
4×	0.201	3.08	0.157	2.87
8×	0.168	5.15	0.123	4.49

It is to be supposed that the reason is that the hydration of the protein molecule increases markedly with dilution. This, however, lacks sound proof, which must be obtained by further experiments.

SUMMARY.

The non-solvent space and the amount of the bound chloride of the blood serum were computed from its chlorine ion activity and its total chloride content experimentally estimated. The conclusions obtained are as follows:

1. The non-solvent space of the serum amounts to about 20 vol. %.

2. The chloride bound to protein molecules in the serum is about 0.006 mol, which is negligible in comparison with its total concentration, about 0.1 mol.

3. When a serum is diluted with water, its non-solvent space increases markedly. When diluted with a KCl solution, the in-

crease in the non-solvent space becomes less with increased concentration of KCl.

TABLE I.

c (mol)	E	pCl'	α'
0.2	-0.02546	0.8718 ± 0.0012	0.6715 ± 0.0042
	-0.02551		
	-0.02582		
	-0.02520		
	-0.02572		
0.1	-0.04082	1.1323 ± 0.0017	0.7375 ± 0.0050
	-0.04011		
	-0.04032		
	-0.04097		
	-0.04054		
0.05	-0.05555	1.3915 ± 0.0011	0.8120 ± 0.0033
	-0.05585		
	-0.05535		
	-0.05532		
	-0.05564		
0.025	-0.07111	1.6612 ± 0.0022	0.8651 ± 0.0059
	-0.07194		
	-0.07114		
	-0.07161		
	-0.07087		
0.0125	-0.08754	1.9456 ± 0.00068	0.9066 ± 0.0019
	-0.08735		
	-0.08766		
	-0.08765		
	-0.08747		
0.00625	-0.10414	2.2315 ± 0.00076	0.9390 ± 0.0018
	-0.10424		
	-0.10395		
	-0.10394		
	-0.10391		

TABLE II.

No.	E'	(Cl')	(Cl')/ α	[Cl]	Increase of [Cl] by addition of KCl
1	-0.03620 -0.03655 -0.03551 -0.03559 -0.03625	0.09104 ± 0.00045	0.1260	0.10634 ± 0.00004	0.00000 ± 0.00006
2	-0.03271 -0.03268 -0.03267 -0.03267 -0.03238	0.10415 ± 0.00019	0.1478	0.12800 ± 0.00005	0.02166 ± 0.00006
3	-0.03003 -0.02984 -0.02984 -0.02994 -0.02997	0.11608 ± 0.00012	0.1680	0.13913 ± 0.00008	0.03279 ± 0.00009
4	-0.02520 -0.02485 -0.02540 -0.02501 -0.02585	0.13979 ± 0.00066	0.2105	0.17336 ± 0.00008	0.06702 ± 0.00009

TABLE III.

No.	E'	(Cl')	(Cl')/ α	[Cl]	Increase of [Cl] by addition of KCl
1	-0.03612 -0.03597 -0.03604 -0.03550 -0.03613	0.09128 ± 0.00029	0.1263	0.10459 ± 0.00005	0.00000 ± 0.00007
2	-0.03311 -0.03294 -0.03299 -0.03361 -0.03371	0.10159 ± 0.00044	0.1433	0.11843 ± 0.00004	0.07384 ± 0.00006
3	-0.02671 -0.02621 -0.02694 -0.02649 -0.02750	0.13166 ± 0.00077	0.1954	0.15858 ± 0.00008	0.05399 ± 0.00009

TABLE IV.
Diluted with water.

	No.	E'	(Cl')	(Cl')/ α	[Cl]	α	$\frac{x_n}{x_1/2^{n-1}}$
a	1	-0.03422 -0.03471 -0.03436 -0.03440 -0.03436	0.09707 ± 0.00021	0.1358	0.10605 ± 0.00007	0.261	1.00
	2	-0.04976 -0.05006 -0.05048 -0.05057 -0.05032	0.05164 ± 0.00021	0.0655	0.05346 ± 0.00003	0.227	1.74
	3	-0.06691 -0.06606 -0.06650 -0.06656 -0.06650	0.02704 ± 0.00010	0.0318	0.02682 ± 0.00005	0.201	3.08
	4	-0.08310 -0.08355 -0.08289 -0.08309	0.01390 ± 0.00005	0.0155	0.01361 ± 0.00010	0.168	5.15
b	1	-0.03446 -0.03432 -0.03434 -0.03433 -0.03413	0.09743 ± 0.00014	0.1365	0.1072 ± 0.0001	0.256	1.00
	2	-0.05009 -0.05009 -0.05011 -0.05013 -0.05009	0.05192 ± 0.00001	0.0661	0.05389 ± 0.00008	0.228	1.78
	3	-0.06675 -0.06647 -0.06615 -0.06640 -0.06591	0.02718 ± 0.00010	0.0321	0.02726 ± 0.00005	0.196	3.06
	4	-0.08279 -0.08217 -0.08256 -0.08269	0.01424 ± 0.00005	0.0159	0.01365 ± 0.00010	0.180	5.91

TABLE V.
Diluted with *M*/50 KCl solution.

	No.	E'	(Cl')	(Cl')/ α	[Cl]	x	$\frac{x_n}{x_1/2^{n-1}}$
a	1	-0.03564	0.09401 ± 0.00060	0.1308	0.10620 ± 0.00009	0.232	1.00
		-0.03547					
		-0.03456					
		-0.03520					
	2	-0.04725	0.05754 ± 0.00023	0.0746	0.06339 ± 0.00009	0.189	1.63
		-0.04761					
		-0.04743					
		-0.04806					
	3	-0.04728					
		-0.05720	0.03838 ± 0.00024	0.0470	0.04225 ± 0.00009	0.132	2.28
		-0.05825					
		-0.05742					
		-0.05786					
	4	-0.06587	0.02809 ± 0.00008	0.0332	0.03150 ± 0.00006	0.072	2.48
		-0.06531					
		-0.06528					
		-0.06559					
b	1	-0.06551					
		-0.03510	0.09562 ± 0.00031	0.1334	0.10600 ± 0.00009	0.248	1.00
		-0.03492					
		-0.03451					
	2	-0.03450					
		-0.03490	0.05843 ± 0.00015	0.0755	0.06359 ± 0.00005	0.196	1.58
		-0.04704					
		-0.04709					
		-0.04687					
	3	-0.04728					
		-0.05805	0.03807 ± 0.00027	0.0465	0.04203 ± 0.00009	0.127	2.05
		-0.05857					
		-0.05710					
		-0.05747					
	4	-0.05825	0.02790 ± 0.00018	0.0330	0.03086 ± 0.00006	0.085	2.74
		-0.06550					
		-0.06600					
		-0.06485					
		-0.06606					
		-0.06596					

TABLE VI.
Diluted with $M/20$ KCl solution.

	No.	E'	(Cl')	(Cl')/ α	[Cl]	x	$\frac{x_n}{x_1/2^{n-1}}$
a	1	-0.03530 -0.03520 -0.03508 -0.03552 -0.03548	0.09362 ± 0.00021	0.1309	0.10472 ± 0.00001	0.244	1.00
	2	-0.04305 -0.04265 -0.04252 -0.04291 -0.04282	0.06950 ± 0.00018	0.0921	0.07796 ± 0.00009	0.184	1.51
	3	-0.04780 -0.04790 -0.04779 -0.04797	0.05676 ± 0.00006	0.0731	0.06474 ± 0.00005	0.133	2.18
	4	-0.05271 -0.05247 -0.05274 -0.05287 -0.05187	0.04705 ± 0.00025	0.0590	0.05710 ± 0.00004	0.045	1.48
b	1	-0.03492 -0.03534 -0.03499 -0.03444 -0.03414	0.09571 ± 0.00055	0.1335	0.10720 ± 0.00003	0.240	1.00
	2	-0.04282 -0.04315 -0.04282 -0.04321 -0.04304	0.06890 ± 0.00015	0.0911	0.07923 ± 0.00005	0.162	1.35
	3	-0.04879 -0.04776 -0.04822 -0.04790 -0.04789	0.05622 ± 0.00028	0.0724	0.06467 ± 0.00007	0.127	2.12
	4	-0.05175 -0.05221 -0.05280 -0.05165 -0.05251	0.04778 ± 0.00033	0.0592	0.05759 ± 0.00005	0.052	1.73

TABLE VII.
Diluted with $M/10$ KCl solution.

	No.	E'	(Cl')	(Cl')/ α	[Cl]	x	$\frac{x_n}{x_1/2^{n-1}}$
a	1	-0.03466 -0.03464 -0.03437 -0.03428 -0.03406	0.09710 ± 0.00030	0.1358	0.10229 ± 0.00005	0.289	1.00
	2	-0.03690 -0.03660 -0.03649 -0.03676 -0.03761	0.08800 ± 0.00046	0.1210	0.10117 ± 0.00011	0.188	1.30
	3	-0.03800 -0.03814 -0.03955 -0.03862 -0.03813	0.08252 ± 0.00063	0.1123	0.10103 ± 0.00007	0.113	1.56
	4	-0.04012 -0.03990 -0.03965 -0.03975 -0.03951	0.07833 ± 0.00022	0.1057	0.10059 ± 0.00015	0.055	1.52
b	1	-0.03460 -0.03447 -0.03483 -0.03476 -0.03446	0.09624 ± 0.00019	0.1346	0.10427 ± 0.00008	0.267	1.00
	2	-0.03711 -0.03645 -0.03660 -0.03666 -0.03666	0.08862 ± 0.00026	0.1219	0.10280 ± 0.00006	0.180	1.35
	3	-0.03806 -0.03822 -0.03756 -0.03901 -0.03944	0.08261 ± 0.00074	0.1124	0.10177 ± 0.00011	0.108	1.62
	4	-0.03895 -0.04040 -0.03929 -0.03956 -0.03886	0.07954 ± 0.00059	0.1075	0.10143 ± 0.00006	0.063	1.89

REFERENCES

- Akagi, S. (1930): Mitteilungen aus d. med. Akademie zu Kioto, IV-2, 113 (Japanese).
- Augsberger, A. (1925): Ergebnis. d. Physiol., **24**, 624.
- Falta, W. und Richter-Quittner, M. (1918) Biochem. Zeitschr. **91**, 381.
- Geffcken, G. (1904) Zeitschr. f. physik. Chem., **49**, 298.
- Itoh, K. (1927): Mitteilungen aus d. med. Akademie zu Kioto, I-1, 175, I-4, 1 (Japanese).
- Itoh, K. (1928): Journ. of Biochem., **2**, 17.
- Katsu, Y. (1927): Journ. of Biophysics, **2**, 109, 123, 133, 151.
- Oda, T. (1930), Biochem. Zeitschr., **218**, 459.
- Polányi, M. (1920): Biochem. Zeitschr., **104**, 237.
- Rona, P. (1910): Biochem. Zeitschr., **29**, 501.
- Rusznayák, S. (1920): Biochem. Zeitschr., **110**, 60.
- Weber, H. and Nachmannsohn, D. (1929): Biochem. Zeitschr., **204**, 213.
- Weber, H. and Versmold, H. (1931): Biochem. Zeitschr., **234**, 62.

ÜBER DIE FERMENTATIVE HYDROLYSE DER HEXOSIDPHOSPHORSÄUREESTER.

VON

SEIICHI OHMIYA.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Akademie
zu Chiba. Direktor: Prof. Dr. S. Akamatsu.)

(Eingegangen am 18. Mai 1933)

Die Phosphatasen-Studien im hiesigen Institut ergaben, dass die Phosphatase recht verschiedene Fermente einschliesst, die experimentell von einander getrennt werden können. Wir haben dann die Phosphomonoesterase (Uzawa, 1932), die Phosphodiesterase (Uzawa, 1932), die Pyrophosphatase (Kurata, 1931; Takahashi, 1932) und die Phosphamidase (Ichihara, 1933) isoliert. Die chemische Konstitution der Substrate, die an und für sich durch das respektive Ferment aufspaltbar sind, ist an der oben erwähnten Nomenklatur der Fermente zu erkennen. Die Phosphoesterase, d.h. die Mono- oder Diesterase spaltet überhaupt die P-O-C-Bindung, die Pyrophosphatase die P-O-P-Bindung und die Phosphamidase die P-N-Bindung. Der Zusammenhang der Phosphatasenspezifität und der chemischen Konstitution der Substrate wurde damit im grossen und ganzen aufgeklärt.

Professor Akamatsu stellte nun auf dem Gebiet des Phosphatasenstudiums ein neues Thema. Es war zu bestimmen, wie sich eine Substanz, die durch irgendein Ferment aufspaltbar ist, bei ihrer Bindung mit der Phosphorsäure gegen das betreffende Ferment und die Phosphatase verhalten würde. Mit anderen Worten kann man den Gedanken so aussprechen, dass die Frage entschieden werden soll, ob ein Ferment, das für die Hydrolyse der R-R'-Bindung spezifisch eingestellt ist, noch auf die R-R'-O-PO(OH)₂-Bindung wirksam sei, und wie die Phosphatase die P-Verbindung angreife. Von solchen P-Verbindungen sind zuerst die Nukleinsäure und die Phosphatide zu erwähnen. Die Nukleinsäure ist das Tetranukleotid, in dem sich wie in dem Mononukleotid

die Phosphorsäure mit dem Nukleosid bindet, das spezifisch durch die Nukleosidase spaltbar ist. Bei den Phosphatiden, z.B. Lezithin, ist der Diglyceridrest mit Cholinphosphorsäure verbunden. Dephosphorierung solcher Substanzen durch die Phosphatasenwirkung ist wohl annehmbar. Aber wie soll sich das Nukleotid resp. die Nukleinsäure gegen die Nukleosidase verhalten und das Lezithin gegen die Lipase? Ausser den wichtigen Zellbestandteilen sind es die synthetisch zugänglichen Phosphorsäurederivate der Hexoside, die auch zur Aufklärung der durch unseren Arbeitsgedanken gestellten Fragen beitragen.

Der Verfasser hat daher Saccharophosphat, Maltophosphat und α -Methylglukophosphat hergestellt und darauf die Hexosidase oder die Phosphatase einwirken lassen. Die Experimente wurden unter Leitung von Prof. Akamatsu ausgeführt.

Für die Experimente mussten die Hexosidase und die Phosphatase voneinander getrennt werden. Die Trennung wurde ausschliesslich durch die Adsorptionsmethode versucht, und eine befriedigende Isolierung konnte erst nach manchen vergeblichen Versuchen erzielt werden. Über die Gewinnung der einzelnen Fermente wird im nachstehenden experimentellen Teil ausführlich berichtet.

Die α -Methylglukosidase, die aus Trockenhefe phosphatasenfrei herzustellen war, spaltete das α -Methylglukophosphat nicht, wie bereits früher von Helferich und Mitarbeiter (1923) angegeben wurde. Wir sind nun also in der Lage auszusprechen, dass α -Methylglukosidase nicht mehr wirksam ist, falls der Glukosidrest phosphoryliert wird. Dieser Befund steht vielleicht in Einklang mit der Angabe von Helferich, Klein und Schäfer (1926), dass das Halogenhydrin oder der Methyläther des α -Methylglukosids der Wirkung der α -Glukosidase widersteht.

Dann wurde die Wirkung der Saccharase auf das Saccharophosphat geprüft. Das Ferment wurde aus Trockenhefe resp. Takadiastase durch das Adsorptionsverfahren phosphatasenfrei hergestellt. Kuhn und Münch (1927) und Neuberg und Sabetay (1925) hatten schon beobachtet, dass die phosphatasenfreie Hefesaccharase das Rohrzuckerphosphat aufzuspalten

vermag. Bei unserem Experiment war dies auch der Fall. Wir fanden aber weiter, dass die phosphatasenfreie Takasaccharase in gleicher Weise das Rohrzuckerphosphat hydrolysierte, ohne dass eine Dephosphorierung nachzuweisen war. Nach der Zweienzymtheorie unterscheidet man Gluko- und Fruktosaccharase, je nachdem das Ferment mit dem Glukose- oder Fruktoserest des Rohrzuckers bindet. Zu der ersten soll die Taka- und zu der letzteren die Hefesaccharase gehören. Wenn die Phosphorsäure im Saccharophosphat ausschliesslich mit dem Glukoserest verbunden ist, wie es von Neuberg und Pollak (1910) angenommen wurde, wäre die Hydrolyse des Saccharophosphats durch die phosphatasenfreie Takasaccharase ausgeschlossen, weil der die Affinität vermittelnde Glukosidrest phosphoryert vorhanden ist. Es gibt aber Experimente, die die Takasaccharase als Fruktosidase ansprechen. Wir wollen aber auf Grund unserer Ergebnisse die Affinitätsfrage der Saccharase nicht eingehend diskutieren, weil unser Rohrzuckerphosphat analytisch zwar den berechneten Phosphorgehalt ergab, jedoch eventuell wegen Beimengung von an dem Fruktosidrest phosphoryierter Substanz nicht einheitlich sein könnte. Das oben erwähnte Verhalten des α -Methylglukophosphats gegen die α -Methylglukosidase in Betracht ziehend, kann aber gesagt werden, dass die Bildung der Ferment-Substrat-Bindung bei unserem Fall ausschliesslich durch den nicht phosphoryerten Hexosidrest vermittelt wurde, und dass der phosphoryerte Hexosidrest nicht daran teilgenommen hat.

Es wurde ausserdem experimentell beobachtet, dass die phosphatasenfreie Hefesaccharase sowohl den Rohrzucker als auch den Phosphorsäureester optimal bei pH 4,2, und die phosphatasenfreie Takasaccharase die beiden Substrate bei pH 5,2 hydrolysierte. Die Einführung des Phosphorsäurerests verursacht also keine Verschiebung des pH -Optimums, soweit der zymophore Hexosidrest intakt bleibt.

Wir haben bei unsern Phosphatasenstudien angenommen, dass die optimale Azidität durch die Dissoziationskonstanten sowohl des Ferments als auch des Substrats bedingt wird, wie es von Asakawa (1929) und Uzawa (1932) diskutiert wurde, und wir

erwarten, dass diese Annahme allgemein für die Fermentwirkung Geltung finde. Da bei der Rohrzuckerspaltung das Disaccharid aber zu den Nichtelektrolyten gehört, kann sich der Einfluss der Azidität bloss auf die Dissoziation der Saccharase beziehen. Das oben erwähnte Ergebnis führte uns zu der zweiten Annahme, dass der Dissoziationszustand des die Affinität nicht vermittelnden Bestandteils des Saccharophosphats, oder im allgemeinen der zusammengesetzten Verbindung, für die Interaktion der Verbindungen mit den Fermenten belanglos ist. Die Gültigkeit dieser Annahme soll zukünftig z.B. bei Polypeptidasen geprüft werden. In dieser Hinsicht ist der Hydrolyseversuch mit dem Maltophosphat sehr interessant.

Die phosphatasenfreie Hefe- und Takamaltase spaltete die Maltose optimal bei PH 6,7. Durch diese Fermente wurde aber das Maltophosphat optimal bei PH 4,2 gespalten. Die Verschiebung der optimalen Azidität nach dem Verestern mit Phosphorsäure ist deshalb besonders sehr merkwürdig, weil sie beim Rohrzuckerphosphat nicht zu beobachten war.

Unsere phosphatasenfreie Hefe- und Takamaltase, die die Maltose zu 70% bei PH 6,7 in 3 Stunden hydrolysierten, waren nicht wirksam auf das α -Methylglukosid. Es konnte unter denselben Bedingungen selbst nach 6 Stunden nicht aufgespalten werden. Leibowitz (1926) hat dieses Ferment Glukomaltase genannt. Die früher erwähnte α -Methylglukosidase zeigte bei PH 6,8 in 4 Stunden ausser 50%iger Hydrolyse des α -Methylglukosids 40%ige Maltosespaltung. Diese Lösung soll daher nach Leibowitz die Glukosidmaltase enthalten. Die Zweienzymtheorie dieses Autors setzt jedoch voraus, dass das auf das α -Methylglukosid wirksame Ferment immer die Maltose spaltet. Für das Spezifitätsproblem der Carbohydrase ist daher dringend erwünscht zu entscheiden, ob nur eine maltasenfreie α -Methylglukosidase oder überhaupt eine maltasenfreie α -Glukosidase vorhanden sei. Jedenfalls war die Fermentlösung, die im vorliegenden Experiment für die Maltophosphathydrolyse gebraucht wurde, ausschliesslich auf die Maltose wirksam. Diese Maltase soll sich bei ihrer Wirkung auf die Maltose sowohl mit dem Glukosidrest als mit dem Glukoserest

verbinden. Man könnte andererseits, die Darstellungsmethode des Präparats in Betracht ziehend, wohl annehmen, dass das Maltophosphat ein Gemisch aus Glukophosphat-Glukosid und Glukose-Glukosidphosphat ist. Bei der ersten Verbindung ist der Glukosidrest intakt, und der Glukoserest, obwohl phosphoriert, behält noch die reduzierende Monosennatur. Bei der zweiten Verbindung ist dagegen der Glukosidrest phosphoriert und soll, wie aus dem Verhalten des α -Methylglukophosphats zu erwarten, der Glukomaltasenwirkung widerstehen. Daher ist die durch die Glukomaltase zerlegbare Verbindung gerade jenes Glukophosphat-Glukosid, und dabei bewirkt die an den Glukoserest gebundene Phosphorsäure die Verschiebung der optimalen Azidität, obwohl wir noch nicht in der Lage sind, den Zusammenhang der Optimumverschiebung mit dem Dissoziationszustand des Maltophosphats aufzuklären.

Das fermentative Verhalten der Hexosidphosphate konnten wir nach unseren jetzigen Ergebnissen leider nicht ohne die obigen Voraussetzungen diskutieren, die wir zukünftig experimentell beweisen möchten. Aber zu der von uns aufgestellten Annahme über die Affinität der Saccharase und Maltase mit dem Saccharophosphat resp. Maltophosphat mögen die Hemmungsversuche mit dem Glukophosphat beitragen. Die Wirkung der Maltase auf das Maltophosphat wurde durch das Glukophosphat stark gehemmt, aber die Invertinwirkung auf Saccharophosphat blieb unbeeinflusst. Das α -Methylglukosid und sein Phosphorsäureester hemmten nicht.

Jedenfalls kann man sagen, dass die phosphorierten Hexoside je nach den Hexosidarten der Wirkung der entsprechenden Hexosidase widerstehen oder unterliegen, wobei das PH-Optimum unverändert bleibt oder von der Azidität abweichen kann, die bei der Hydrolyse des ursprünglichen Hexosids als das PH-Optimum bewiesen worden ist.

Die Wirkung der Phosphomonoesterase wurde auf das Saccharophosphat und Glukophosphat geprüft. Die drei Typen der Monoesterase wurden dazu saccharasenfrem hergestellt. Die Experimente ergaben, dass die beiden Zuckerphosphate sich gegen die

Monoesterase in gleicher Weise wie die üblichen Phosphorsäuremonoester verhalten. Die Optima wurden nämlich bei P_{H} 3,0, 5,5 resp. 9,0 gefunden.

Das Glukophosphat war leichter dephosphorierbar als das Saccharophosphat. Den saccharasenfreien Monoesteraselösungen fehlte auch die Maltasenwirkung. Die Herstellung der Phosphomonoesterase hat bei den vorliegenden Experimenten keine besonderen Ergebnisse geliefert. Aber wir denken, dass solche Arten Monoesterase, die frei von Carbohydrase herstellbar sind, das weitere Studium der Nukleotidspaltung befördern werden.

EXPERIMENTELLER TEIL.

A. Darstellung der Fermentlösung.

1. Takasaccharase.

4%ige Takadiastase wurde gegen destilliertes Wasser dialysiert, bis sie frei von anorganischem Phosphor war. Sie war hoch aktiv sowohl auf den Rohrzucker als auch auf das Glycerophosphat. Um sie von der Phosphatase zu befreien, wurden 200 ccm Takadialysat, 20 ccm $M/2$ Natr. Acetat, 4 g Magnesium Carbonat (Merek) eine Stunde geschüttelt und dann zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde gegen destilliertes Wasser dialysiert. Die Lösung enthielt ausser der Saccharase auch Maltase aber keine Phosphatase.

2. Hefesaccharase.

Die Invertinlösung wurde nach Willstätter und Racke (1921) durch die rasche Autolyse der frischen Hefe mittels Toluols und Essigesters und nachheriges Behandeln des Autolysats mit Bleiacetat hergestellt. Die entbleite Lösung wurde der Dialyse bis zum Freiwerden von anorganischem Phosphor unterworfen. Sie spaltete den Rohrzucker kräftig, war aber inaktiv auf das Glycerophosphat.

3. Hefemaltase.

Die Maltasenlösung, die nach Willstätter und Bamann

(1926) aus frischer Hefe hergestellt und gegen destilliertes Wasser dialysiert wurde, enthielt die Phosphomonoesterase. Um die Phosphatase abzutrennen, wurde das Dialysat mit Bleiacetatlösung versetzt, bis kein Niederschlag darin entstand, und das Filtrat mittels H_2S entbleit und dialysiert. Die so erhaltene Lösung war reich an Maltase aber frei von Phosphatase.

4. Hefe- α -Methylglukosidase.

Trockene Hefe wurde mit 0.1%igem Ammoniakwasser vom 10 fachen Gewicht der Hefe versetzt und gut gemischt bei Zimmertemperatur der Autolyse überlassen. Nach einem Tage wurde das Autolysat zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit gegen destilliertes Wasser über Nacht dialysiert. Das Dialysat wurde bei 37° unter vermindertem Druck bis zum 1/10 Volumen eingedampft. Die konzentrierte Fermentlösung war wirksam sowohl auf das α -Methylglukosid als auch auf die Maltose, aber nicht auf das Glycerophosphat.

5. Takaphosphomonoesterase.

Diese Fermentlösung konnte saccharasenfrei wie folgt hergestellt werden: 10 g Takadiastase in 200 ccm Wasser, 50 ccm $M/2$ Essigsäure und 50 g Kaolin wurden eine Stunde geschüttelt und zentrifugiert. Das ganze Kaolinadsorbat wurde dann 2mal mit 250 ccm $M/10$ Essigsäure gewaschen, mit dem Gemisch von 50 ccm $M/2$ Acetatpuffer (Essigsäure 17,4 ccm : Natr. Acetat 32,6 ccm) und 200 ccm 2%igem Natr. Glycerophosphat versetzt und unter bisweiligem Schütteln 3 Stunden im Wasserbad von 37° gelassen. Die abzentrifugierte Lösung wurde im Kollodiumsack 2 Tage gegen destilliertes Wasser dialysiert. Diese Fermentlösung war phosphatasehaltig, aber ganz frei von Saccharase und Maltase.

6. Kleienphosphomonoesterase.

Als diese Fermentlösung diente nach der Angabe von Uzawa (1932) der dialysierte wässrige Extrakt von Reiskleie. Sie war saccharasen- und maltasenfrei.

7. *Nierenphosphomonoesterase.*

Diese Lösung nach Asakawa (1928) enthielt keine Hexosidase. Darin war aber ausser dem dritten Typ der Monoesterase noch der erste Typ desselben Ferments vorhanden. Die reine Monoesterase von dem ersten Typ konnte aber, wie unten folgt, aus Darmschleimhaut hergestellt werden. Dabei musste die beigemengte Saccharase durch das Adsorptionsverfahren beseitigt werden.

8. *Darmphosphomonoesterase.*

Ich habe frische Dünndarmschleimhaut des Kaninchens mittels eines Objektträgers ausgekratzt und mit Seesand und Chloroform in einer Porzellanschale fein zerrieben. Der Organbrei wurde mit dem 10fachen Volumen physiologischer Kochsalzlösung versetzt und bei 37° eine Stunde extrahiert, dann filtriert. Das Filtrat wurde mit 1/10 Volumen $M/2$ Natr. Acetat und 1/10 Volumen 20%igem Magnesiumhydroxyd versetzt und eine Stunde unter zeitweisem Umrühren in ein Wasserbad von 37° gestellt. Nach dem Zentrifugieren wurde die überstehende Flüssigkeit gegen destilliertes Wasser dialysiert. Sie war saccharasenfrie.

B. *Darstellung der Substrate.*

1. *Saccharophosphorsäure.*

Das Calciumsalz dieser Zuckerestersäure wurde nach Neuberg (1910) hergestellt. 0,5739 g lufttrockenen Salzes wogen 0,4987 g nach dem Trocknen bei 80° über P_2O_5 unter vermindertem Druck. Gewichtsverlust 0,0752 g. Es enthielt also 3 Moleküle Kristallwasser. Calcium wurde gravimetrisch und Phosphor colorimetrisch nach Fiske-Subbarow (1925) bestimmt.

Für $C_{12}H_{21}O_{14}PCa(460,3)$ berechnet: P 6,74%, Ca 8,70%,
gefunden: P 6,71%, Ca 8,60%.

2. *Maltophosphorsäure.*

Das Calciumsalz dieser Zuckerestersäure und der nachstehenden α -Methylglukosidphosphorsäure wurde in gleicher Weise wie das Saccharomonophosphat hergestellt. Das Calcium Malto-

phosphat enthielt 4 Moleküle Kristallwasser.

Für $C_{12}H_{21}O_{14}PCa$ (460,3) berechnet: P 6.74%, Ca 8.70%,
gefunden: P 6.72%, Ca 8.83%.

3. *α -Methylglukosidphosphorsäure.**

Das Calciumsalz enthielt 2 Moleküle Kristallwasser.

Für $C_7H_{13}O_9PCa$ (312,2) berechnet: P 9.94%,
gefunden: P 9.93%.

4. *Glukosephosphorsäure.*

Das Calciumglukophosphat wurde nach dem Verfahren von Neuberg (1910) durch die partielle Hydrolyse des Saccharophosphats und Maltophosphats hergestellt. Die beiden Disaccharidphosphate lieferten hinsichtlich des Reduktionsvermögens und des hemmenden Einflusses auf die Saccharo- und Maltophosphat-spaltung dasselbe Glukophosphat.

Für $C_6H_{11}O_9PCa$ (298,2) berechnet: P 10.41%,
gefunden: P 10.40%.

C. *Versuchsanordnung.*

I. *Phosphatasenuntersuchung.*

Die Zusammensetzung der Versuchslösung war wie folgt:

Substratlösung	5.0 ccm
Puffer	1.0 „
Fermentlösung	4.0 „

Die Substratlösung war $M/100$ bei Natriumglycerophosphat und $M/500$ bei Zuckerphosphat.

Versuchstemperatur 37° . Pufferlösung; $M/10$ Glykokoll-HCl, $M/2$ Essig-Acetat oder $M/10$ Glykokoll-Natron. PH wurde gleich nach Anstellung des Versuchs elektrometrisch bestimmt. Phosphorbestimmung nach Fiske-Subbarow. Die in den folgenden Protokollen angegebenen Ziffern bedeuten den abgespalteten anorganischen Phosphor in mg für 2 ccm der Versuchslösung berechnet. Die 100%ige Hydrolyse soll also 0.06208 mg P liefern.

* Das α -d-Methylglukosid wurde nach Patterson und Robertson (J. chem. Soc. London, 1929, 300) dargestellt. $[\alpha]_D^{18^\circ} = +158^\circ$.

11. Hexosidasenuntersuchung.

Die Versuchslösung setzte sich zusammen aus:

<i>M</i> /50 Substrat	5.0 ccm
Puffer	1.0 „
Fermentlösung	2.0 „
Wasser	2.0 „

Die Endkonzentration des Substrats war daher *M*/100.

Die Saccharasen- wie die Maltasenlösung war sehr aktiv und musste vorher mit Wasser verdünnt werden, um dadurch die hydrolytischen Beträge bei verschiedenen Aziditäten leicht vergleichbar zu machen. Die α -Methylglukosidasenlösung war aber nicht stark genug wirksam und wurden daher nach der Herstellung, wie oben erwähnt, konzentriert. Die ganzen Versuche hindurch wurden dieselben Fermentlösungen gebraucht.

Gleich nach der Anstellung der Versuche und nach 1 oder 3 Stunden wurde die Reduktion nach Hagedorn und Jensen an 0.1 ccm bei Versuchen mit Rohrzucker, Maltose, Maltophosphat und α -Methylglukosid, an 1.0 ccm bei Saccharophosphat gemessen und auf Glukose umgerechnet. Die Differenz der beiden mg-Zahlen ergab also die Zunahme der Reduktion als Glukose gerechnet. Diese Zahlen sind in den nachstehenden Protokollen angegeben.

Nach der Hagedorn-Jensenschen Methode war das Reduktionsvermögen der Fruktose 92% desjenigen der Glukose. Das der Maltose betrug 73%, das des Maltophosphats 23% und das des Glukophosphats 19% des Glukosenwerts von gleicher Mol-Konzentration.

Die Ermittlung der reduzierenden Kraft des Zuckerderivates wurde genau nach der Vorschrift von Hagedorn und Jensen (1923) ausgeführt, aber nicht, wie bei Robison (1931) mit Extrazusatz von Alkali. Das Zinkhydroxyd riss das Zuckerphosphat nicht mit, wie von Neuberg (1931) festgestellt.

Aus dem oben zitierten Reduktionsvermögen der einzelnen Zuckerarten kann man leicht die totale Reduktion bei 100%iger Hydrolyse als Glukose berechnen. Z.B. soll 0.1 ccm *M*/100 Maltophosphat bei vollständiger Spaltung in Glukose und Glukophosphat

eine Reduktion zeigen, die 0.1728 mg der Glukose entspricht. Durch solchen berechneten Glukosenwerten werden die zeitlich bei den Versuchen ermittelten Glukosenmengen dividiert, wodurch das hydrolytische Prozent erhalten wurde.

VERSUCHSERGEBNISSE.

A. *Phosphatase.*

I. Wirkung der Takaphosphomonoesterase.

TABELLE I.
Natrium-Glycerophosphat. (M/200).

PH	2 Stunden	
	P in mg	Spaltung %
2.4	0.0096	15.5
3.3	0.0541	87.1
4.0	0.0037	6.0

TABELLE II.
Ca-Saccharophosphat. (M/1000).

PH	1/2 Stde.	1 Stde.	2 Stdn.	Spaltung %
2.5	0	Spur	0.0050	8.0
3.3	0.0081	0.0085	0.0173	27.8
4.0	Spur	Spur	0.0076	12.2
4.9	0	Spur	Spur	0
5.8	0	0	Spur	0
6.8	0	0	0	0
8.5	0	0	0	0

TABELLE III.
Glukosephosphorsaures Ca. (M/1000).

PH	1/2 Stde.	1 Stde.	2 Stdn.	Spaltung %
2.04	0.0134	0.0197	0.0199	32.1
2.52	0.0138	0.0269	0.0279	43.5
3.07	0.0152	0.0316	0.0319	51.4
3.98	0.0150	0.0305	0.0317	51.1
4.94	0.0145	0.0290	0.0315	50.8
5.91	0.0140	0.0220	0.0235	37.9
6.72	0.0129	0.0145	0.0150	24.1

II. Wirkung der Reiskleienphosphomonoesterase.

TABELLE IV.
Natrium-Glycerophosphat. ($M/200$).

PH	2 Stunden	
	P in mg	Spaltung %
4.0	0.0293	47.2
5.7	0.0340	54.8
6.0	0.0323	52.0

TABELLE V.
Ca-Saccharophosphat. ($M/1000$).

PH	1/2 Stde.	1 Stde.	2 Stdn.	Spaltung %
2.5	0.0012	0.0018	0.0020	3.2
3.3	0.0038	0.0041	0.0058	9.3
4.0	0.0066	0.0088	0.0117	18.7
4.9	0.0074	0.0088	0.0121	19.5
5.6	0.0074	0.0088	0.0121	19.5
5.8	0.0067	0.0084	0.0115	18.5
7.1	0.0051	0.0084	0.0111	17.9

TABELLE VI.
Glukosephosphorsaures Ca. ($M/1000$).

PH	1/2 Stde.	1 Stde.	2 Stdn.	Spaltung %
3.07	0.0132	0.0171	0.0266	42.9
3.98	0.0153	0.0210	0.0272	43.8
4.94	0.0181	0.0245	0.0292	47.1
5.61	0.0197	0.0251	0.0301	48.4
6.01	0.0169	0.0235	0.0275	44.3
6.72	0.0081	0.0123	0.0166	26.7
8.14	Spur	0.0064	0.0153	24.6

III. Wirkung der Nierenphosphomonoesterase.

TABELLE VII.
Natrium-Glycerophosphat. ($M/200$).

PH	2 Stunden	
	P in mg	Spaltung %
3.3	0.0238	38.4
6.0	0.0111	17.9
6.9	0.0018	2.9
8.7	0.0324	52.2
9.1	0.0399	64.3

TABELLE VIII.
Ca-Saccharophosphat ($M/1000$).

PH	1/2 Stde.	1 Stde.	2 Stdn.	Spaltung %	24 Stdn.	
2.5	0	0	0	0	0.0144	23.1%
3.3	0	Spur	Spur	0		
4.0	0	0	0	0		
4.9	0	0	0	0		
5.8	0	0	Spur	0		
6.8	0	Spur	0.0097	15.6		
8.5	Spur	0.0065	0.0109	17.5		
8.9	0.0069	0.0120	0.0149	23.9		
9.8	Spur	0.0051	0.0084	10.3		
10.0	0	0	Spur	0		

IV. Wirkung der Darm-Phosphomonoesterase.

TABELLE IX.
Glukosephosphorsaures Ca. ($M/1000$).

PH	1/2 Stde.	1 Stde.	2 Stdn.	Spaltung %
4.94	0	0	0	0
5.91	Spur	Spur	Spur	0
6.72	0.0066	0.0141	0.0200	32.2
8.14	0.0136	0.0204	0.0266	42.9
9.16	0.0151	0.0222	0.0298	48.0
9.94	Spur	0.0059	0.0067	10.8

B. Hexosidase.

I. Wirkung der Takasaccharase.

TABELLE X.
Saccharose.

PH	1 Stunde		3 Stunden	
	Glukose in mg	%	Glukose in mg	%
1.84	0.0021	0.6	0.0021	0.6
2.42	0.0138	4.0	0.0138	4.0
3.28	0.0276	8.0	0.0346	10.0
3.95	0.0453	13.1	0.0798	23.1
4.51	0.0629	18.2	0.1296	37.5
4.86	0.0671	19.4	0.1314	38.0
5.35	0.0671	19.4	0.1334	38.6
5.83	0.0556	16.1	0.1224	36.0
6.14	0.0256	7.4	0.1182	34.2
6.66	0.0121	3.5	0.0775	25.3
7.04	0.0073	2.1	0.0501	14.5
7.78	0	0	0.0138	4.0
8.42	0	0	0	0

TABELLE XI.
Ca-Saccharophosphat.

PH	Glukose in mg			anorganischer P
	1 Stde.	3 Stdn.		3 Stunden
2.01	0	0.0060	0.3%	0
2.58	0.0145	0.0325	1.6	0
2.86	0.0240	0.0455	2.2	Spur
3.79	0.0712	0.0845	4.2	Spur
4.15	0.0801	0.1603	8.0	0
4.66	0.0845	0.1759	8.8	0
5.12	0.0845	0.1821	9.1	0
5.82	0.0642	0.1668	8.3	0
6.30	0.0476	0.1205	6.0	0
7.72	0.0124	0.0413	2.0	0

II. Wirkung der Hefesaccharase.

TABELLE XII.

Saccharose.

PH	1 Stunde		3 Stunden	
	Glukose in mg	%	Glukose in mg	%
1.85	0	0	0	0
2.29	0	0	0.0073	2.1
2.43	0.0041	1.2	0.0225	6.5
3.65	0.0484	14.0	0.1559	45.1
4.33	0.0798	23.1	0.1804	52.2
4.91	0.0708	20.5	0.1728	50.0
5.51	0.0598	17.3	0.1531	44.3
5.84	0.0498	14.4	0.1384	40.1
6.24	0.0397	11.5	0.1255	36.3
6.75	0.0321	9.3	0.0774	22.4
7.36	0.0045	1.3	0.0363	10.5
8.12	0	0	0.0073	2.1

TABELLE XIII.

Ca-Saccharophosphat.

PH	Glukose in mg			anorganischer P
	1 Stde.	3 Stdn.		3 Stunden
2.02	0	0.0039	0.2%	0
2.57	0.0120	0.0300	1.5	0
2.79	0.0180	0.0360	1.8	0
3.79	0.0517	0.1638	8.2	0
4.18	0.0579	0.1759	8.8	0
4.67	0.0579	0.1718	8.6	0
5.10	0.0538	0.1656	8.3	0
5.79	0.0337	0.1319	7.6	0
6.31	0.0199	0.0959	4.8	0
7.73	0.0039	0.0060	0.3	0

III. Wirkung der Hefemaltase.

TABELLE XIV.

Maltose.

PH	3 Stunden	
	Glukose in mg	%
3.87	0.0774	33.9
4.25	0.0908	39.7
5.08	0.1264	55.3
5.61	0.1514	61.9
6.71	0.1807	79.0
8.10	0.0990	43.3
8.48	0.0461	20.1

TABELLE XV.

Maltosephosphorsaures Ca.

PH	Glukose in mg			anorganischer P
	1 Stde.	3 Stdn.		3 Stunden
2.30	0	0	0%	0
3.90	0.0121	0.0141	8.1	0
4.23	0.0181	0.0222	12.1	0
5.06	0.0121	0.0141	8.1	0
6.68	0.0081	0.0121	7.6	0
8.79	0.0040	0.0040	2.3	0

IV. Wirkung der Takamaltase.

TABELLE XVI.

Maltose.

PH	3 Stunden	
	Glukose in mg	%
3.87	0.0727	31.8
4.25	0.0882	38.5
5.08	0.1235	54.0
5.61	0.1400	61.2
6.72	0.1677	73.3
8.10	0.0939	41.1
8.48	0.0414	18.1

TABELLE XVII.
Maltosephosphorsaures Ca.

PH	Glukose in mg			anorganischer P
	1 Stde.	3 Stdn.		3 Stunden
2.30	0	0	0%	0
3.92	0.0181	0.0262	15.0	Spur
4.23	0.0262	0.0302	17.4	0
5.06	0.0141	0.0262	15.0	0
6.68	0.0121	0.0222	12.8	0
8.79	0.0081	0.0081	4.6	0

V. Wirkung der Hefe- α Methylglukosidase.TABELLE XVIII.
 α -Methylglukosid.

PH	4 Stunden	
	Glukose in mg	%
3.76	0.0081	4.5
4.81	0.0726	40.3
5.78	0.0807	44.8
6.85	0.7867	48.1
8.00	0.0807	44.8
8.50	0.0706	39.2

TABELLE XIX.
Maltose.

PH	4 Stunden	
	Glukose in mg	%
4.85	0.0040	1.7
5.80	0.0585	25.6
6.84	0.0908	39.7
8.00	0.0686	30.0
8.40	0.0544	23.7

Diese Fermentlösung spaltete das α -Methylglukophosphat bei PH 1,9–10 selbst nach 6 Stunden nicht.

C. Hemmungsversuch der Saccharase und Maltase.

Hauptversuch.

<i>M</i> /50 Ca-Saccharophosphat	5.0 ccm
Puffer	1.0 „
<i>M</i> /10 hemmende Substanzen	1.0 „
Saccharase	3.0 „

Kontrollversuch.

<i>M</i> /50 Ca-Saccharophosphat	5.0 ccm
Puffer	2.0 „
Saccharase	3.0 „

Die Endkonzentration der Substrate und der hemmenden Substanzen war daher *M*/100. Die Reduktionsvermehrung in 0.1 ccm der Versuchslösung wurde durch die Hagedorn-Jensensche Methode gemessen. Die Versuchsanordnung bei Maltase war ganz die gleiche.

TABELLE I.

Ca-Saccharophosphat + Hefesaccharase (PH 4.1).

3 Stunden		
	in mg Glukose	%
Kontrollversuch	0.0604	30.2
Glukosephosphorsäure	0.0585	29.2
α -Methylglukosid	0.0604	30.2
α -Methylglukosidphosphorsäure	0.0604	30.2

TABELLE II.

Ca-Saccharophosphat + Takasaccharase (PH 5.2).

3 Stunden		
	in mg Glukose	%
Kontrollversuch	0.0383	19.1
Glukosephosphorsäure	0.0363	18.1
α -Methylglukosid	0.0383	19.1
α -Methylglukosidphosphorsäure	0.0383	19.1

TABELLE III.

Maltosephosphorsaures Ca. + Takamaltase. (PH 4.2).

3 Stunden		
	in mg Glukose	%
Kontrollversuch	0.0545	31.5
Glukosephosphorsäure	0.0282	16.3
α -Methylglukosid	0.0545	31.5
α -Methylglukosidphosphorsäure	0.0545	31.5

Die Bestimmung des Reduktionswertes erfolgte nach Hagedorn und Jensen an 0.1 ccm Versuchslösung. Die Berechnung der zunehmenden Reduktion als Glukose sowie des hydrolytischen Prozents wurde schon oben erwähnt.

LITERATUR.

- Asakawa, K. (1929): Journ. of Biochem., **11**, 143.
 Fiske, C. u. Subbarow, Y. (1925): Journ. of biol. Chem., **66**, 375.
 Hagedorn, H. C. u. Jensen, B. N. (1923): Biochem. Zeitschr., **135**, 46. u. **137**, 92.
 Helferich, B. u. Klein, W. u. Schäfer, W. (1926): Ber. Deut. Chem. Gesell., **59**, 79.
 Helferich, B. u. Löwa, A. u. Nippe, W. u. Riedel, H. (1923): Zeitschr. f. physiol. Chem., **128**, 141.
 Ichihara, M. (1933): Journ. of Biochem., **18**, 87.
 Kuhn, R. u. Münch, H. (1927): Zeitschr. f. physiol. Chem., **163**, 9.
 Kurata, K. (1931): Journ. of Biochem., **14**, 25.
 Neuberg, C. u. Pollak, H. (1910): Biochem. Zeitschr., **23**, 515.
 Neuberg, C. u. Pollak, H. (1910): do. **26**, 514.
 Neuberg, C. u. Sabetay, S. (1925): do. **162**, 479.
 Neuberg, C. u. Kobel, M. (1931): do. **238**, 236.
 Robison, R. u. King, E. (1931): Biochem. Journ., **25**, 328.
 Takahashi, H. (1931): Journ. of Biochem., **16**, 447. u. **16**, 467.
 Uzawa, S. (1932): do. **15**, 1. u. **15**, 19.
 Willstätter, R. u. Bamann, E. (1926): Zeitschr. f. physiol. Chem., **151**, 268.
 Willstätter, R. u. Racke, F. (1921): Ann. d. Chem., **425**, 53.

CHEMIE DER GASTROPODENEIER.

VON

TEKI KUMON.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der medizinischen Fakultät
in Nagasaki. Vorstand: Prof. Dr. M. Tomita.)

(Eingegangen am 22. Mai 1933)

Diejenigen Eier, welche ausserhalb des mütterlichen Organismus sich entwickeln, müssen entweder alle Elemente des jungen Tieres enthalten, oder sie brauchen von aussen eine Stoffzufuhr. Man darf wohl annehmen, dass die Ursache der Verschiedenheiten der im Organismus jeder einzelnen Tierspecies ablaufenden chemischen Erscheinungen wenigstens zum Teil schon auf die frühere Eizeit zurückzuführen ist.

Es erschien mir von diesem Gesichtspunkt aus interessant, die chemische Zusammensetzung der sich entwickelnden Eier verschiedener Tierspecies vergleichend zu betrachten und dadurch die natürlichen Verwandtschaftsverhältnisse der Tiere zu ermitteln.

Die bisher zur chemischen Untersuchung kaum herangezogenen Gastropodeneier sind in einer Kapsel geborgen, deren Inhalt aus Laich und einer Mukoids substanz besteht. Die Kapseln sind von ganz verschiedener Gestalt: Urnen oder flache Dosen, die in Reihen oder Haufen angeordnet sind. Die von *Hemifusus tuba* Gmel. sind flach, bikonvex, derb, in grossen Mengen in Reihen angeordnet.

Um eine Mobilisierung einzelner Eibestandteile und ihre Überführung in den Embryo während der Bebrütung zu ersehen, muss man die organischen und anorganischen Stoffe in ganz verschiedenen Entwicklungsstadien des jungen Tieres möglichst systematisch verfolgen. Im Anschluss an eine frühere Arbeit über Hühner- und Reptilieneier, habe ich mich mit der Frage beschäftigt, wie die Eiweisskörper, der Gesamtstickstoff, die Reststickstoffformen und die Aschen sich bei der Bebrütung des Gastropodeneies verhalten.

I. Der Eiweisskörper des Laichs, der Mukoidsubstanz und der Eikapsel von mittelreifen Gastropodeneiern.

Um das Laicheiweiss von dem Mukoid zu trennen, wurden 3050 g Eisackflüssigkeit (aus 2435 mittelreifen Eikapseln) von *Hemifusus tuba* Gmel. mit der gleichen Menge Wasser verdünnt und unter Zusatz von Essigsäure bis zur schwach sauren Reaktion in siedendes Wasser eingegossen und weiter gekocht, bis man ein klares Filtrat bekam, welches für die Mukoiddarstellung benutzt wurde. Die voluminöse Koagula wurde in einem Koliertuch gepresst und dann mit Alkohol und Äther gründlich extrahiert. Die so gereinigte weisse Masse besteht hauptsächlich aus Eiweiss. Sie wurde als "Rohvitellin" bezeichnet (45 g).

Die das Ovomukoid enthaltende Lösung wurde zum Sirup eingengt und in absoluten Alkohol eingegossen, die entstandene weisse Substanz durch wiederholte Umfällung gereinigt und dann getrocknet. Sie wog 25,0 g.

Das "Rohvitellin" und das Mukoid wurden auf bekannte Weise mit Schwefelsäure hydrolysiert, und aus dem Hydrolysate wurden die Hexonbasen nach Angabe von Kossel und Kutseher getrennt. Aus dem Phosphorwolframsäurefiltrate wurden die einzelnen Monoamino-säuren nach dem Fischer'schen Verfahren isoliert.

Bei der Bearbeitung der Eikapseln wurden einerseits 100 g Versuchsmaterial mit konzentrierter Salzsäure hydrolysiert und hierauf nach der von Fischer angegebenen Methode verarbeitet. Andererseits wurden 100 g Material mit Schwefelsäure hydrolysiert, und auf bekannte Weise die einzelnen Diamino-säuren isoliert.

Die Gesamtmenge der aus dem "Rohvitellin", dem Mukoid und den Eikapseln von *Hemifusus tuba* Gmel. isolierten Amino-säuren ist in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

II. Über das Verhalten des im Gastropodenei vorhandenen Reststickstoffes bei der Entwicklung.

Die in den früheren Abhandlungen (1921-1929) mitgeteilten an Hühner- und Reptilieneiern gewonnenen Erfahrungen über das Verhalten der Reststickstoffformen bei der Entwicklung werden

TABELLE I.

Material	“Rohvitellin”	Mukoid	Kapseleiweiss
Aminosäuren			
	%	%	%
Glykokoll	0	?	?
Alanin	0,80	1,05	1,62
Valin	0,30	?	0,65
Leucin	10,55	9,50	20,72
Isoleucin	0	?	1,60
Prolin	1,10	2,25	0,76
Phenylalanin	0,25	1,30	0,54
Tyrosin	0,75	0,10	?
Asparaginsäure	1,60	1,42	Spur
Glutaminsäure	0	1,80	9,10
Arginin	3,75	0,65	3,11
Lysin	0,85	0,25	4,97
Histidin	?	?	?

im folgenden auf Gastropodeneier angewandt.

Um die Mengenverhältnisse der Reststickstoffformen gegenüber dem Gesamtstickstoff zu finden, habe ich zuerst die Gesamtstickstoffmenge des Einhaltes auf bekannte Weise ermittelt.

Der Gesamteinhalt wurde in der Reibschale zerrieben und mit konzentrierter Schwefelsäure in der Hitze gelöst. Die schwefelsaure Lösung wurde in einen geaichten Kolben aufgefüllt. Ein aliquoter Teil davon wurde dann verascht und weiter kjeldahlisiert. Bei den Versuchen fand jedesmal 1 Ei Verwendung. Für jede Versuchsreihe wurden 10 Versuche unternommen. Die einzelnen Versuchsergebnisse stimmen bei allen Entwicklungsstadien immer sehr gut überein, und man konnte daraus ohne Zwang Mittelwerte ziehen. Es folgt hier eine Tabelle, die die in den verschiedenen Versuchen erhaltenen Mittelwerte an Gesamtstickstoff im Gastropodenei enthält.

Man sieht, dass die Gesamtstickstoffmenge in dem ganzen Einhalt des Gastropodeneies viel kleiner ist, als die des Vogel- und Reptilieneies, und dass der Gesamtstickstoff bei der Eientwicklung

TABELLE II.

Entwicklungs- stadium	Gewicht des Eiinhalt g	Gesamt-N.	
		g	%
Anfangsstadium	2,051	0,0049	0,241
Mittelstadium	2,003	0,0071	0,354
Endstadium	2,089	0,0101	0,483

eine geringfügige Zunahme erfährt. Diese Vermehrung sollte auf Mobilisierung des Stickstoffes aus den Eikapseln oder dem Seewasser beruhen. Da nun die Stickstoffmenge der Eikapseln, wie aus folgender Tabelle ersichtlich, während der ganzen Entwicklungsperiode keine Abnahme erfährt, so musste der Stickstoff aus dem Seewasser in irgend einer Form in die Kapsel diffundieren.

TABELLE III.

Entwicklungs- stadium	Gewicht der Eikapsel g	Gesamt-N.	
		g	%
Anfangsstadium	0,2690	0,0163	6,059
Mittelstadium	0,3440	0,0189	5,494
Endstadium	0,3010	0,0188	6,246

Zur Bestimmung der Reststickstoffe verwendete ich als Untersuchungsmaterial 802 junge, 752 mittelreife und 1372 reife Eier. Der Gesamteiinhalt wurde zunächst bis zur Koagulation erhitzt. Man setzte zum Filtrat kolloidale Eisenhydroxylösung zu und beseitigte die minimal zurückbleibenden Eiweisskörper mit der Tanninmethode. Die enteiweisste Lösung wurde nun in einen 200 ccm grossen Kolben aufgefüllt. An dieser Lösung wurde nun folgende Bestimmungen ausgeführt:

1. In 30 ccm davon wurde der Stickstoff nach Kjeldahl in bekannter Weise ermittelt und als Gesamtstickstoff bezeichnet.

2. Zu 150 ccm der Lösung wurde so viel Schwefelsäure gefügt, bis die Flüssigkeit 5% davon aufwies; dann wurde mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der Stickstoffgehalt in dem Phos-

phorwolframsäureniederschlag wurde nach Kjeldahl bestimmt und als Reststickstoff von durch Phosphorwolframsäure fällbarer Natur bezeichnet.

3. Das Filtrat des Phosphorwolframsäureniederschlages wurde mit Bariumcarbonat neutralisiert, filtriert und auf kleines Volumen eingeeengt. Aus der Lösung wurde der Aminostickstoff nach van Slyke in bekannter Weise ermittelt.

Die Ergebnisse finden sich, auf 100 Eier berechnet, in folgender Tabelle kurz zusammengestellt.

TABELLE IV.

Entwicklungs- stadium	Gewicht des Einhaltens von 100 Eiern g	Gesamt- Rest-N.		Rest-N. von P-W-S. fäll- barer Natur		Rest-N. von durch P-W-S. nicht-fällbarer und nach van Slykescher Methode bestimmbarer Natur	
		g	%	g	%	g	%
Anfangsstadium	191,4	0,0072	0,0037	0,0000	0,0000	0,0013	0,0006
Mittelstadium	194,0	0,0111	0,0057	0,0028	0,0014	0,0032	0,0016
Endstadium	193,0	0,0277	0,0143	0,0102	0,0052	0,0052	0,0027

Aus den angeführten Befunden ergibt sich, dass die im Gastropodenei vorhandenen Reststickstoffformen sich während der Eientwicklung stetig vermehren. Vergleicht man nun die Resultate mit den beim Vogel- und Reptilienei gewonnenen, so fällt es auf, dass die Menge des Reststickstoffes im Gastropodenei sehr gering ist.

III. Über das Verhalten der anorganischen Bestandteile bei der Entwicklung des Gastropodeneies.

Zu den Versuchen wurden jedesmal 100 Eier gebraucht. Soweit nun zunächst die quantitative Analyse sich auf die festen Stoffe bezieht, hat sie folgende Zusammensetzung ergeben. (Tab. V)

Bei Betrachtung der angeführten Tabelle sieht man, dass der Aschengehalt im Endstadium bedeutend zunimmt.

Die Alkalien, Erdalkalien und die Schwefelsäure wurden

TABELLE V.

Entwicklungs- stadium	Gewicht des Ei- inhaltes von 100 Eiern g	Wasser- gehalt		Troeken- substanz		Org. Substanz		Anorg. Substanz	
		g	%	g	%	g	%	g	%
Anfangsstadium	189,00	179,44	94,94	9,52	5,04	5,88	3,11	3,64	1,92
Mittelstadium	195,40	185,46	94,91	9,96	5,10	6,03	3,08	3,93	2,01
Endstadium	195,00	182,16	93,41	12,73	6,53	6,05	3,10	6,67	3,42

gravimetrisch bestimmt. Zur Ermittlung des Chlors bediente ich mich der Methode von Volhard. Die Phosphorsäure wurde zuerst als Ammoniummagnesiumphosphat gefällt, dann auf bekannte Weise in das Phosphorsäuremolybdat übergeführt und nach der Vorschrift von Neumann titrimetrisch ermittelt. Die Kieselsäure wurde nach dem Verfahren von Gonnermann bestimmt.

Die quantitative Zusammensetzung der einzelnen Mineralbestandteile lässt sich zunächst der Übersichtlichkeit halber am besten aus folgender Zusammenstellung übersehen:

TABELLE VI.

Entwicklungs- stadium	Mineralbestandteile im ganzen Einhalt %							
	K ₂ O	Na ₂ O	CaO	MgO	P ₂ O ₅	SO ₃	Cl	SiO ₂
Anfangsstadium	0,0056	0,9535	0,0156	0,0880	0,0400	0,0660	1,0034	0,0018
Mittelstadium	0,0346	0,9314	0,0406	0,0947	0,0450	0,1186	1,0328	0,0036
Endstadium	0,0586	0,9276	1,2647	0,0973	0,0554	0,1420	0,9178	0,0137

Stellt man die Einzelbestandteile der Aschen bei den verschiedenen Stadien einander gegenüber, so findet sich in dem späteren Stadium eine beträchtliche Vermehrung des Kalks, was darauf hindeutet, dass der Kalk vom Seewasser durch die Eikapsel hineindiffundiert und zum Aufbau des Embryos verwendet wird. Der Hauptteil der Aschen (über 70%) besteht aus Kochsalz. Diese auffallende Tatsache dient zur Erzielung der besten Bedingungen für den Embryo für die Anpassung an das umgebende Medium. Es ergab sich weiter als wesentlicher Befund, dass das Kochsalz im

Endstadium etwas abzunehmen scheint, um einer Vermehrung von Kalium Platz zu machen. Hierbei muss besonders darauf hingewiesen werden, wie verschieden untereinander der Stoffwechsel der einzelnen Mineralbestandteile der sich entwickelnden Eier bei verschiedenen Tieren ist, offenbar weil sie ganz verschiedenen Zwecken im Körperhaushalt dienen.

LITERATUR.

- Nakamura, Y. (1928): Hoppe-Seylers Zs., **177**, 34.
Nakamura, Y. (1929): Jl. of Biochem., **10**, 357.
Tomita, M. (1921): Biochem. Zs., **116**, 12.

ÜBER DIE FARBENREAKTIONEN VON STRYCHNIN UND STRYCHNINNITRAT.

VON

HIDEKATSU FUJIWARA.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der medizinischen
Fakultät in Nagasaki. Direktor: Prof. M. Tomita.)

(Eingegangen am 23. Mai 1933)

Der Nachweis einer Intoxikation kann auf klinischem, pathologisch-anatomischem, chemischen und pharmakologischen Wege geliefert werden. Sichere Kennzeichen einer Vergiftung sind an der Leiche durch Obduktion nicht erhältlich. Man muss sich bescheiden und die Wahrheitsermittlung der analytisch-toxikologischen Untersuchung der während des Lebens beobachteten Symptome und der chemischen Erforschung, die vieles in dieser Beziehung zu leisten vermag, überlassen. Der chemische Nachweis eines Giftes ist natürlich von ausserordentlicher Beweiskraft, denn die Auffindung desselben bezeugt eben mehr als alles andere seine Einführung in den Körper.

Das Strychnin, eines von den wichtigen Alkaloidgiften, findet sich neben Brucin in verschiedenen Arten des Genus *Strychnos*, die in tropischen Asien und Afrika einheimisch sind. Seine Wirkungsweise gleicht im Grossen und Ganzen der des Brucins, nur ist die tetanisierende Aktion des Strychnins wesentlich stärker, die lähmende Wirkung dagegen viel undeutlicher ausgebildet. Die Gelegenheiten zur Strychnin-Vergiftung sind mannigfaltig. Gar nicht selten wird Strychnin von Mördern verwendet. Es dient vielfach zum Vergiften von Raubzeug, dadurch ist es einmal den Verbrechern zugänglich, zum anderen Mal passieren Unglücksfälle durch Versehen und Verwechselung. Der sichere Nachweis der Strychnin-Vergiftung ist natürlich neben der klinischen Symptomatologie und der physiologischen Prüfung des isolierten Alkaloides an Tieren durch den chemischen Nachweis des Giftes in der Leiche oder im Erbrochenen zu erbringen.

Wie für alle chemischen Substanzen, so kommt auch für Gifte

zum Zweck der qualitativen Bestimmung von kleinen Mengen in erster Linie die Farbenreaktion in Betracht. Von besonderem Interesse ist die Farbenreaktion für die Erkennung einzelner, in ihren sonstigen Eigenschaften sich nur wenig unterscheidender Alkaloide. Viele Farbenreaktionen des Strychnins werden aber von mehreren Alkaloiden gegeben und haben daher nur die Bedeutung von Gruppenreagentien. Was nun die Spezialreagentien des Strychnins betrifft, welche nur für es oder höchstens noch für einige ihm chemisch verwandte Substanzen Ausschlag geben, so wurde das Mandelins Reagens durch Salpeter oder Salpetersäure sehr gestört; salpetersaures Strychnin gibt daher die Probe nur sehr undeutlich oder gar nicht. Die meisten Farbenreaktionen des Strychnins beruhen auf einer Oxydation des Alkaloides und verschiedene Substanzen dienen dabei als Oxydationsmittel. Die Färbung muss dadurch je nach der Konzentration der Säuren und gemäss den Zusatzmitteln verschieden sein.

Von diesem Gedanken ausgehend, habe ich das Verhalten vieler Alkaloide und anderer Verbindungen zu den verschiedenen Reagentien untersucht. Die einzelnen Versuchsergebnisse werden in den Tabellen (II, III u. IV) kurz zusammengestellt.

Es zeigt sich dabei, dass sich Strychnin, salpetersaures Strychnin, Brucin, Curare und Veratrin zu verschiedenen Reagentien untereinander ähnlich verhalten. Zu der konzentrierten Salzsäure, auch bei der nachherigen Alkalisierung oder beim Zusatz von Phosphormolybdänsäure, verhalten sich Strychnin und Brucin sehr ähnlich. Auf dieselben Reagentien reagieren salpetersaures Strychnin, Curare und Veratrin gruppierend. Wenn man den oben erwähnten Alkaloiden konzentrierte Salzsäure und Natriummolybdat zusetzt und erhitzt, so entsteht eine rote Färbung. Beim Abschwächen der Acidität mit Soda oder beim Zusatz von Phosphormolybdänsäure wird nur salpetersaures Strychnin gelb. Setzt man dem Strychnin konzentrierte Schwefelsäure und eine grosse Menge von konzentrierter Natriummolybdatlösung zu, so tritt eine rote Färbung auf. Das Reagens ist ein Spezialreagens von Strychnin. Fröhdes Reagens ist konz. Schwefelsäure, welche pro Kubikcentimeter 10 mg molybdänsaures

Natrium oder Ammonium enthält. Mit diesem Reagens gibt Strychnin keine Farbenreaktion.

Der Übersichtlichkeit halber sind die Ähnlichkeit und die Verschiedenheit des Verhaltens der oben erwähnten Alkaloide zu den betreffenden Reagentien im folgenden tabellarisch dargestellt.

TABELLE Ia.

Name der Subst.	+konz. HCl, kochen, dann abkühlen			
	ohne weitere Behandlung	Abschwächen d. Acidität mit Soda	Alkalisieren mit Soda	+ 5% Phosphormolybdänsäurelösung
Strychnin	0	0	weisslich getrübt	blau
Strychninnitrat	rubin- oder weinrote Färbung	rötlich gelb	gelb	gelb bis grünlich gelb
Brucin	0	0	0	blau
Curare	gelbe bis weinrote Färbung	rötlich gelb	gelb	blau
Veratrin	rubinrote Färbung	schwach rot	schwach gelb	blau

TABELLE Ib.

Name der Subst.	+konz. HCl + conc. Na-Molybdatlösung, kochen, dann abkühlen			
	ohne weitere Behandlung	Abschwächen d. Acidität mit Soda	Alkalisieren mit Soda	+ 5% Phosphormolybdänsäurelösung
Strychnin	rubin- oder weinrote Färbung	blau getrübt	schwach blau od. weisslich getrübt	blau getrübt
Strychninnitrat	rubin- oder weinrote Färbung	schwach gelb	gelb	gelb oder grünl. gelb
Brucin	rote Färbung (bald gelb bis braun)	blau getrübt	dunkelgelb od. grünl. braun	blau getrübt
Curare	gelbe bis rote Färbung	blau	schwach blau	blau
Veratrin	rubin- oder weinrote Färbung	blau	gelblich od. bläulich	blau

TABELLE Ie.

Name der Subst.	+konz. Schwefelsäure u. conc. Na-Molybdatlösung (20-25%)	+konz. Schwefelsäure + grosse Menge von Na-Molybdatlösung
Strychnin	rot	rot
Strychninnitrat	gelb bis braun	grünlich gelb
Brucein	karminrot, bald gelb	grün bis blau
Curare	rot bis braun	blau
Veratrin	rot	blau bis violett

TABELLE II.

Name der Subst.	+konz. Salzsäure, kochen, dann abkühlen	Abschwächen d. Acidität mit konz. Sodalösung	Alkalisieren mit Soda in Substanz	Zusatz von 5% Phosphormolybdänsäurelösung
Strychninnitrat	rubin-oder weinrote Färbung	rötlich gelb	gelb	gelb bis grünlich gelb
Strychnin	keine Färbung	farblos	weisslich getrübt	blau
Brucein	keine Färbung	farblos	farblos	blau
Curare	gelbe bis weinrote Färbung	rötlich gelb	gelb	blau
Pilocarpinhydrochlorid	keine oder schwach gelbe Färbung	farblos	farblos	gelblich getrübt
Atropinsulfat	keine Färbung	farblos	farblos	gelblich getrübt
Hyoscyaminhydrochlorid	keine Färbung	farblos	farblos	gelblich getrübt
Skopolaminhydrochlorid	keine Färbung	farblos	farblos	gelblich getrübt
Homatropinhydrochlorid	keine Färbung	farblos	farblos	gelblich getrübt
Cocainhydrochlorid	keine Färbung	farblos	weisslich getrübt	gelblich getrübt
Chininhydrochlorid	keine Färbung	farblos	weisslich getrübt	weisslich od. gelblich getrübt
Cinchonin	keine Färbung	farblos	weisslich getrübt	weisslich od. gelblich getrübt

Morphin-hydrochlorid	keine Färbung	farblos	farblos	blau
Apomorphin-hydrochlorid	keine Färbung (farblos)	farblos (farblos)	blau bis violett (violett)	blau (blau) (ohne Kochen)
Dionin	keine Färbung	farblos	farblos	schwach blau
Heroinhydrochlorid	keine Färbung	farblos	farblos	blau
Narkotin	keine oder schwach gelbe Färbung	farblos od. schwach gelb	weisslich getrübt	bläulich getrübt
Physostigmin-salicylat	schwach gelbe Färbung	schwach gelb	schwach rot	blau
Veratrin	rubinrote Färbung	schwach rot	schwach gelb	blau
Santonin	keine oder schwach gelbe Färbung	farblos od. weisslich getrübt	weisslich getrübt	blau
Coffein	keine Färbung	farblos	farblos	farblos od. bläulich
Theophyllin	keine Färbung	farblos	farblos	farblos od. bläulich
Theobromin	keine Färbung	farblos	farblos	farblos od. bläulich
Digitamin	schwach gelbe Färbung	farblos	farblos	farblos od. bläulich
Indol	gelbe bis rote Färbung	schwach gelb	weisslich getrübt	blau
Skatol	schwach gelbe Färbung	schwach gelb	weisslich getrübt	blau
Tryptophan	keine Färbung	farblos	farblos	schwach blau
Brenztraubensäure	gelbe bis weinrote Färbung	gelb	gelb bis weinrot	blau
Glukose	keine oder schwach rote Färbung	farblos od. schwach gelb	schwach rot	schwach blau
Fructose	rubin- od. weinrote Färbung	gelb	weinrot	blau
Saccharose	rubin- oder weinrote Färbung	gelb	weinrot	blau
Hydroxylamin-hydrochlorid	keine Färbung	farblos	farblos od. schwach rot	blau

Phenylhydrazin- hydrochlorid	keine oder schwach gelbe Färbung	farblos	schwach gelb	blau
Brenzcatechin	keine Färbung	farblos	kirschrot	blau
Resorzin	keine oder schwach gelbe Färbung	farblos od. schwach gelb	schwach rot	blau
Orcin	keine oder schwach gelbe Färbung	farblos od. schwach gelb	schwach rot	blau
Phloroglucin	keine oder schwach gelbe Färbung	farblos od. schwach gelb	schwach rot	blau
Protocatechu- aldehyd	gelbe Färbung	schwach gelb	schwach rot	blau
Vanillin	keine oder schwach gelbe Färbung	farblos	farblos od. schwach gelb	blau
Gallussäure	keine Färbung	farblos	schwach rot	blau
Dermatol	keine Färbung	farblos	schwach rot	blau
Pyramidon	keine Färbung	farblos	farblos	blau
Salpetersäure	gelbe Färbung	schwach gelb	fast farblos	schwach gelb

TABELLE III.

Name der Subst.	+ konz. Salz- säure u. konz. Natrium- molydat- lösung (20- 25%), kochen, dann abkühlen	Ab- schwächen d. Azidität mit konz. Sodalösung	Alkalisieren mit Soda in Substanz	Zusatz von 5% Phosphor molybdän- säurelösung
Strychninnitrat	rubin-oder weinrote Färbung	schwach gelbe	gelb	gelb oder grünlich gelb
Strychnin	rubin-oder weinrote Färbung	blau ge- trübt	schwach blau od. weisslich getrübt	blau getrübt
Brucin	rote Färbung (bald gelb bis braun)	blau ge- trübt	dunkel- gelb od. grünl. braun	blau getrübt
Curare	gelbe bis rote Färbung	blau	schwach blau	blau
Pilocarpin- hydrochlorid	keine oder schwach gelbe Färbung	farblos	farblos od. weisslich getrübt	gelblich getrübt

Atropinsulfat	keine oder schwach gelbe Färbung	farblos	farblos od. weisslich getrübt	gelblich getrübt
Hyoscyaminhydrochlorid	keine oder schwach gelbe Färbung	farblos	farblos od. weisslich getrübt	gelblich getrübt
Skopolaminhydrochlorid	keine oder schwach gelbe Färbung	farblos	farblos	gelblich getrübt
Homatropinhydrochlorid	keine oder schwach gelbe Färbung	farblos	farblos	gelblich getrübt
Cocainhydrochlorid	keine oder schwach gelbe Färbung	farblos	weisslich getrübt	gelblich getrübt
Chininhydrochlorid	keine oder schwach gelbe Färbung	farblos	weisslich getrübt	weisslich od. gelblich getrübt
Cinchonin	keine oder schwach gelbe Färbung	farblos	weisslich getrübt	weisslich od. gelblich getrübt
Morphinhydrochlorid	schwach gelbe Färbung	blau	schwach blau	blau
Apomorphinhydrochlorid	gelblich-braune Färbung (violett)	blau (gelb, grün —blau)	bräunlich gelb (violett)	blau (blau)
Dionin	keine oder schwach gelbe Färbung	blau	schwach blau	blau
Heroinhydrochlorid	schwach gelbe Färbung	blau	schwach blau	blau
Narkotin	schwach gelbe Färbung	blau	schwach blau	blau
Physostigminsalicylat	gelblichrote Färbung	blau	schwach dunkelgrün	blau
Veratrin	rubin- oder weinrote Färbung	blau	gelblich od. bläulich	blau
Santonin	braun	blau	grünlich od. bräunlich gelb	blau
Coffein	keine oder schwach gelbe Färbung	farblos	farblos	farblos od. bläulich
Theophyllin	keine oder schwach gelbe Färbung	farblos	farblos	farblos od. bläulich

Theobromin	keine oder schwach gelbe Färbung	farblos	farblos	farblos od. bläulich
Digitamin	schwach gelbe Färbung	blau	schwach gelb	blau
Indol	rote bis röt- lichbraune Färbung	blau	gelblich- braun	blau
Skatol	rötlich- braune Färbung	blau	gelblich- braun	blau
Tryptophan	grünlich- braune Färbung	blau	gelblich grün	blau
Brenztrauben- säure	gelbe bis weinrote Färbung	blau	grünlich- gelb bis braun	blau
Glukose	schwach gelb- lichrote Färbung	blau	schwach blau	blau
Fructose	gelbe bis weinrote Färbung	blau	dunkelgrün bis gelb- lich braun	blau
Saccharose	gelbe bis weinrote Färbung	blau	gelblich- braun	blau
Hydroxylamin- hydrochlorid	grüne Färbung	blau	bräunlich- gelb	blau
Phenylhydrazin- hydrochlorid	hellgrüne Färbung	blau	bräunlich- gelb	gelb
Brenzcatechin	grünlichgelbe bis grüne Färbung	blau	bräunlich- gelb	blau
Resorzin	gelblichrote Färbung	blau	violett	blau
Orcin	gelblichrote Färbung	blau	violett	blau
Phloroglucin	bräunlich- rote Färbung	blau	violett	blau
Protocatechu- aldehyd	gelbe Färbung	grünlich- gelb	gelb	blau
Vanillin	gelbe Färbung	blau	schwach blau	blau
Gallussäure	gelblich- grüne Färbung	blau	gelb bis dunkelgrün	blau
Dermatol	grüne Färbung	blau	dunkelgrün bis braun	blau
Pyramidon	grüne Färbung	blau	gelblich- grün	blau
Salpetersäure	gelbe Färbung	schwach gelb	fast farblos	schwach grünlich gelb

TABELLE IV.

Name der Subst.	konz. Schwefelsäure u. konz. Na-Molybdatlösung (20–25%)	nach weiterem Zusatz von Na-Molybdatlösung
Strychnin	rot	rot
Strychninnitrat	gelb bis braun	grünlich gelb
Brucein	karminrot, bald gelb	grün bis blau
Curare	rot bis braun	blau
Pilocarpinhydrochlorid	farblos	farblos oder schwach gelb
Homatropinhydrochlorid	farblos	farblos oder schwach gelb
Morphinhydrochlorid	rot, bald grün	blau
Apomorphinhydrochlorid	grün bis blau	blau
Dionin	grün	blau
Heroinhydrochlorid	violettrot, bald grün	blau
Narkotin	weinrot, bald grün	blau bis violett
Veratrin	rot	blau bis violett
Indol	blau	blau
Skatol	blau, bald braun	dunkelbraun
Tryptophan	rot bis braun	dunkelgrün bis braun
Hydroxylaminhydrochlorid	farblos	schwach blau
Phenylhydrazinhydrochlorid	grün bis blau	blau
Pyramidon	grün bis blau	blau
Aethylalkohol	grün bis blau	blau

LITERATUR.

- Almén: Z. f. analyt. Chemie, **8**, 77.
 Autenrieth, W.: Z. f. analyt. Chemie, **42**, 76.
 Bruylants, G.: Z. f. analyt. Chemie, **37**, 62.
 De Dominicis, A.: Z. f. analyt. Chemie, **45**, 266.
 Dobriner, P.: Z. f. analyt. Chemie, **39**, 469.
 Dobriner, P.: Z. f. analyt. Chemie, **41**, 575.
 Flückiger: Z. f. analyt. Chemie, **28**, 102.
 Fröhde: Z. f. analyt. Chemie, **5**, 214.
 Giotto, F. u. Spica, E.: Z. f. analyt. Chemie, **38**, 134.

- Guérin, G.: Z. f. analyt. Chemie, **50**, 535.
Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis, **2**, ss. 595, 792, 793 u. 794 (1927).
Ipsen, C.: Z. f. analyt. Chemie, **37**, 64.
Ipsen, C.: Z. f. analyt. Chemie, **66**, 397.
Itallie, L. v. u. Steenhauer, A. J.: **78**, 477.
Lander, G. D.: Chem. Zbl., (1930) II, 3061.
Laves, G.: Z. f. analyt. Chemie, **37**, 61.
Malaquin, P.: Z. f. analyt. Chemie, **49**, 656.
Noyes, W. A. u. Späth, Ed.: Z. f. analyt. Chemie, **38**, 400.
Reichard, C.: Z. f. analyt. Chemie, **42**, 95.
Reichard, C.: Z. f. analyt. Chemie, **49**, 700.
Salant, W.: Z. f. analyt. Chemie, **48**, 69.
Sedgwick, W. F.: Z. f. analyt. Chemie, **20**, 421.
Selmi, F.: Z. f. analyt. Chemie, **18**, 292.
Tattersall, T.: Z. f. analyt. Chemie, **20**, 119.
Tafel, J.: Z. f. analyt. Chemie, **38**, 743.
Wagenaar, M.: Chem. Zbl., (1930) I, 1191 u. 869.
Welborn, G.: Z. f. analyt. Chemie, **47**, 269.
Wieland, H., Calvet, F. u. Moyer, W. W.: Liebigs Ann., **491**, 107.
Woltering: Z. f. analyt. Chemie, **36**, 410.
Wöber, A.: Z. f. analyt. Chemie, **62**, 256.

ÜBER DEN CHOLESTERIN-GEHALT DER MUSKULATUR VON FISCHEN

VON

SHISHIRO NAMIKI.

*(Ausgeführt unter der Leitung von Prof. K. Hotta, Aus dem Biochemischen
Institut der medizinischen Fakultät zu Nagoya.)*

(Eingegangen am 5. Juni 1933)

EINLEITUNG.

Von Embden und seinen Schülern schon wurden verschiedene charakteristische chemische Unterschiede zwischen den rasch arbeitenden, leicht ermüdbaren weissen und den langsam sich kontrahierenden, dafür aber zu grosser Dauerleistung befähigten roten Muskeln festgestellt. Bei Kaninchen und Hühnern nimmt mit steigender Fähigkeit der Muskeln zu andauernder Arbeit nicht nur der Cholesterin- und Restphosphorsäuregehalt, sondern auch das Sarkoplasma zu. Daraufhin habe ich untersucht, ob bei Fischen (Teleostei) sich auch eine ähnliche Gesetzmässigkeit für die Cholesterinwerte feststellen lässt.

MATERIAL.

Als Material zu den vergleichenden Untersuchungen wählte ich für den ersten Versuch die Muskulatur verschiedener Fischarten, deren Köpermuskulatur, je nach der Art, aus blassen, oder aus rötlich gefärbten Fasern besteht. Beim zweiten Versuche verwendete ich zwei Fleischarten ein und derselben Art, d.h. gewöhnliches und rotes Fleisch. (Siehe unten). Die Muskulatur der Fische zeigt eine sehr primitive Struktur. Sie besteht nämlich aus zahlreichen Myomeren, die durch eine Seitenlinie in dorsale und ventrale Portionen geschieden werden. Zwischen den zwei grossen Muskelpartionen liegt das zur Körperachse parallel laufende, keilförmige Fleisch, dessen Basis der Körperoberfläche zugekehrt ist und eine charakteristische rosarote Farbe hat, weshalb

man dieses das rote Fleisch oder rote Faser nennt.

Nach Shaun stammt dieses rote Fleisch vom gewöhnlichen ab. Diese roten Fasern sind reichlich vorhanden in denjenigen Arten von Fischen, welche viel und ausdauernd schwimmen; und der stark beanspruchte Schwanzteil enthält mehr rote Fasern als der dicht hinter dem Kopfe.

Bei den Versuchen war ich in den meisten Fällen auf Material aus Fischhandlungen angewiesen.

METHODE.

Die Bestimmung des Cholesterins wurde stets an möglichst frischem Fleische mittels meiner Modifikationsmethode in der früher von Embden und Lawaczek beschriebenen Weise ausgeführt.

Sowohl bei dem gewöhnlichen Fleische wie auch bei dem roten wurden Haut, Nerven, Bindegewebe und kleine Gräten sorgfältig entfernt.

In der Fischmuskulatur kommt gelblichgrüne, schmutzig-braune oder gelblichbraune Färbung beim Hinzufügen von Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure vor, welche manchmal die kolorimetrische Untersuchung erschwert.

Solche Missfärbung haben schon J. Fex wie auch J. A. Gardner und F. W. Fox bei Cholesterinbestimmungen beobachtet.

Letzterer gab an, dass bei der Verseifung des Materials wegen mangelhafter Spaltung des Cholesterinesters eine sirupöse Substanz zurückbliebe, die mit Liebermann's Reagens die oben erwähnten Missfärbungen zeigte. Aber bei Kaninchen- und Hühnerorganen hat im Laufe mehrerer Jahre niemand in unserem Institute solche Missfärbungen beobachtet. Erst jetzt habe ich diese Schwierigkeit bei Fischen gehabt.

Das Fett der Fische enthält mehr ungesättigte Fettsäure als das der Vögel und Säugetiere.

Daraus geht hervor, dass das Fett der Fische sehr schwer verseifbar sein dürfte.

Diese Tatsache lehrt, dass zur Cholesterinbestimmung der Fischmuskulatur nur ein ganz vollständig wirkendes Verseifungs-

mittel irgend einer Methode erforderlich ist.

Wie sich in Tabelle I und II zeigt, machte ich nur einfache Experimente. Verseifung mit 25% iger Kalilauge allein (1 und 3 in Tabelle I) ruft einen dunklen Farbton hervor, und lässt die Liebermann-Burchard'sche Reaktion misslingen.

TABELLE I.

Art	No.	Verseif.-mittel	Liebermann-Burchard R.	Farbton	Cholesterin-geh. g%
Trachurus japonicus (Ag I)	1	25% KOH	a) schmutzig braun b) gelblich grün	dunkel	— 0.181
	2	*	a) grün b) grün	hell	0.050 0.054
Bonito (Katsuo)	3	25% KOH	a) gelblich grün b) gelblich	dunkel	* 0.163 0.095
	4	*	a) grün b) grün	hell	0.046 0.045

* mit 25% KOH 1 Stunde lang gekocht, dann mit Alkohol und 5% Nat.-alkoholat 1 Stunde lang verseift.

TABELLE II.

Makrele	Subst. menge	20% NaOH	5% Nat.-alkoholat	Alkohol	Bemerk.
1)	ca. 2 g	10 cem	10 cem	40 cem	sirupös
2)	"	"	20 "	30 "	sirupös
3)	"	"	30 "	20 "	getrocknet
4)	"	"	40 "	10 "	getrocknet
5)	"	20 cem	—	—	sirupös

Im Falle 1 war deshalb die Kolorimetrie sehr schwierig, und der Cholesterinwert hoch bzw. unbestimmbar.

2 und 4 in derselben Tabelle wurden mit Natriumalkoholat

verseift, und der diesmalige Farbton war hell. Da die Liebermann-Burchard'sche Reaktion infolgedessen ausgezeichnet funktioniert, konnte man sehr leicht kolorimetrieren und der Cholesterinwert ist stets bestimmt.

Die in den Tabellen gegebenen Resultate ergaben sich, indem man das Material vorher mit 20%iger Natronlauge auflöste und mit Alkohol vollkommen verseifen liess, damit das Natriumalkoholat genügend wirken konnte.

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass 30 ccm Natriumalkoholat und 20 ccm Alkohol geeignete Mengen sind.

So wurde dann Natriumalkoholat statt gewöhnlicher Kalilauge als Verseifungsmittel angewendet. Der dadurch gewonnene Rückstand darf nicht sirupös sein; und es stellte sich heraus, dass die Liebermann-Burchard'sche Reaktion in keinem Falle verhindert wird, wenn man in der angegebenen Weise verfährt.

Zur Bestimmung wiegt man ungefähr 2 g des gewöhnlichen Fleisches oder ungefähr 1 g des roten in einen ca. 100 ccm fassenden Erlenmeyer'schen Kolben ab, übergiesst es mit der zehnfachen Menge 20%iger Natronlauge, erwärmt es eine Stunde lang im Wasserbade bis das Fleisch sich auflöst, und fügt dann 20 ccm Alkohol und 30 ccm 5%iges Natriumalkoholat hinzu. Darauf wird es wieder eine Stunde lang im siedendem Wasserbade unter Rückflusskühler behandelt, worauf man im stark siedenden Wasserbade den Alkohol gänzlich verjagt. Die alkalische Flüssigkeit wird mit ungefähr 50 ccm wasserfreiem Äther ausgezogen, und dieses 6 mal wiederholt.

Jede einzelne Ätherfraktion wird einmal mit etwas weniger als der ihr entsprechenden Menge Wasser bis zur Lackmusneutral-Reaktion geschüttelt. Die vereinigten Ätheranszüge werden sodann im Trockenschrank bei etwa 60°C völlig getrocknet.

Im Übrigen verfährt man in der von Embden und Lawaczek geschilderten Weise.

ERGEBNISSE.

Die Ergebnisse meiner sämtlichen Versuche sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt.

I. Versuch.

Ich bespreche zunächst den ersten Versuch, bei dem ich den Cholesteringehalt im gewöhnlichen Fleische von 3 Unterordnungen angehörigen in der Tabelle unter einander angeordneten 12 Fischarten untersuchte.

Bei den Versuchen 1, 5, 8, 9, 11 und 12 sind die für das gefärbte gewöhnliche Fleisch ermittelten Werte höher als die des blassen, gewöhnlichen Fleisches. Doch gibt es einige Ausnahmen, nämlich die der Versuche 3 und 10.

Die Werte des gewöhnlichen Fleisches schwanken zwischen etwa 0,035% beim Versuche 12 und 0,077% beim Versuche 9.

Obige Cholesterinwerte entsprechen denen der weissen Muskulatur von Kaninchen, Hühnern und Rindern.

Der Gehalt an Trockensubstanz ist im allgemeinen im gefärbten, gewöhnlichen Fleische höher als im blassen.

II. Versuch.

Geht nun Rotfärbung und Cholesteringehalt von Fischfleisch ein und desselben Fisches noch deutlicher parallel?

Zur Entscheidung dieser Frage habe ich wieder 12 Fischarten untersucht.

Ausser dem Cholesteringehalt wurden der Trockensubstanzgehalt und der Gesamphosphorgehalt bestimmt. Die Bestimmung des Gesamphosphors wurde nach der Modifikationsmethode in der von Fiske und Subbarow beschriebenen Weise ausgeführt.

Die Werte des gewöhnlichen Fleisches schwanken zwischen 0,039% (beim Versuche 8) und 0,069% (beim Versuche 1). Die des roten Fleisches dagegen liegen zwischen 0,103% (beim Versuche 3) und 0,146% (beim Versuch 9). Diese Cholesterinwerte entsprechen denen in den Herzmuskeln von Kaninchen und Hühnern.

Die Proportionszahl des gewöhnlichen Fleisches zum roten beträgt durchschnittlich 1:2,5.

Der Cholesteringehalt in der Trockensubstanz liegt zwischen 0,144% und 0,295% für das gewöhnliche Fleisch, während er für das rote zwischen 0,324% und 0,518% liegt.

TABELLE III.
Cholesteringehalt im gewöhnlichen Fleische.
7/II—23/III 1931.

No.	Subordnung	Art u. Lokalname	Körperlänge	Farbe	Cholesteringehalt mg%	Trockensgeh. g%	Cholesteringehalt in 100 g Trock. sub. mg
1	Salmonichapeiformes	Lachs (Shake)	36	orange gelb	70,43 73,05	25,96	280,96
2	Mugiliformes	Schlegel (Ina)	15	rötlich	47,87		
3	Acanthopterygii	(Tribe Perciformes) Meeräsche (Tai)	15	weisslich	47,02 42,02	41,89	222,02
4	"	(Tanagotai)	20	weisslich	39,92 33,44	21,04	194,72
5	"	Sparus latus (Kurotai)	22	weisslich	54,70	22,62	239,25
6	"	(Tribe Scombriformes) Makrele (Saba)	22	weisslich braun	48,84 50,08 66,71	22,87	216,08
7	"	Bonito (Katsuo)	30	rötlich	60,29 47,16	28,95	219,34
8	"	Thunfisch (Maguro)		rötlich	42,20	28,96	154,28
9	"	Tetrapturus		rötlich	70,29		
10	"	mitsukurii (Kajiki)		rötlich	72,20	33,12	216,41
11	"	Seriola aureovittata (Buri) (Tribe Zeorhombi) Kareius bicoloratus (Ishigarèi)		weisslich	77,39 42,26 47,03	28,97	267,07
12	"	Paralichthys olivaceus (Hirame)	25 27	weisslich weisslich	43,31 41,49 36,47 34,65	32,80 20,07 19,65	136,88 211,46 196,58

TABELLE IV.
Cholesteringehalt im gewöhnlichen u. roten Fleische.
28/X—8/II 1932.

No.	Nomenklatur, Lokalname	Körperlänge cm	Cholesterin mg%	Gesamt. P. mg%	Trock. sub. g%	Cholest. mg in 100 g Trock. subst.	Cholesterin mg%	Gesamt. P. mg%	Trock. sub. g%	Cholest. mg in 100 g Trock. subst.
1	Salmonidae Sardina melanosticta, Sardine, (Iwashi) Cyprini-siluriformes	16(3)	68,94	272,43	23,40	294,61	121,43	302,19	28,85	440,90
2	Cyprinus carpio, Karpfen, (Koi) Mugiliformes	25	61,35	232,59	20,80	294,91	142,68	254,37	27,71	518,51
3	Mugilicephalus, Meeräsche, (Bora) Acanthopterygii, Tribe Perciformes	57	49,46	216,78	24,98	177,98	103,46	237,47	32,03	324,63
4	Paraperistipoma trineatum, (Isaki) Tribe Scombriformes	30	43,47	242,02	23,12	188,02	144,96	333,59	29,94	500,90
5	Scomber japonicus, Makrele,	33	60,29	304,91	28,95	208,26	143,08	321,74	32,68	437,32
6	Katsuwonus palamys, Bonito, (Katsuo)	36	46,94	294,24	20,62	227,64	105,23	338,14	25,78	408,18
7	Thunnus orientalis, Thunfisch, (Maguro)		56,80	280,72	25,16	225,76	132,49	269,32	30,16	439,30
8	Xiphias gladius, Schwertfisch, (Sabu)		38,68	278,35	26,90	143,92	107,32	283,12	24,78	433,33
9	Seriola aureovittata, Schlegel, (Buri)	75	64,05	312,79	28,49	224,82	145,25	236,65	30,93	472,83
10	(India), Junger Buri	36	57,92	284,65	25,09	224,85	119,92	276,20	27,24	440,13
11	Trachurus japonicus, (Aji)	22	50,41	255,52	23,94	210,57	113,72	276,16	26,09	455,88
12	Decapturus merozoi (Muroaji)	28	65,47	273,76	26,92	244,20	132,80	284,75	32,22	437,82
	Mittel		38,64	216,78	20,80	143,92	103,46	237,47	24,78	324,63
	Maximum		68,94	312,79	28,95	294,91	146,25	338,14	32,68	518,51
	Minimum		54,91	270,73	24,88	226,97	139,77	292,81	28,95	439,19

Der Trockensubstanzgehalt des roten Fleisches ist meistens höher als der des gewöhnlichen, mit nur einer Ausnahme, nämlich Versuch 8.

Dagegen ist die Gesamtphosphormenge in beiden Fleischarten nur wenig verschieden, nämlich die im gewöhnlichen Fleische verhält sich gegen die im roten wie 0,264:0,287, mit Ausnahme der Versuche 7 und 10.

DISKUSSION.

Die Muskulatur von Fischen enthält keine so grosse Menge von Fett wie die von Kaninchen, Rindern und Hühnern, ist aber merkwürdigerweise schwer verseifbar. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass in den Fischen ein anderer Cholesterinester als in den oben genannten Tieren vorhanden ist.

Verwendet man anstatt Kalilauge Natriumalkoholat, so ist das Verseifen sehr leicht und der Farbton der Liebermann-Burchard'schen Reaktion genau gleich dem der Standardlösung.

Unterschiede der Cholesterinmenge in der gewöhnlichen Muskulatur von Knochenfischen hängen logischerweise nicht von der Färbung, sondern von der Individualität ab.

Doch zeigt die Muskulatur ein und desselben Fisches auch Unterschiede zwischen rotem und gewöhnlichem Fleische bezüglich des Cholesteringehaltes, entsprechend den früher festgestellten Unterschieden zwischen der zu grosser Dauerleistung befähigten roten und der leicht ermüdbaren weissen Muskulatur von Kaninchen und Hühnern.

Rotes Fleisch ist im allgemeinen reichlich bei denjenigen Arten vorhanden, welche, wie Bonito und Thunfisch, viel und ausdauernd schwimmen.

Auf Grund dieser Anschauungen kam ich zu dem Schlusse, dass auch bei Fischen, wie bei Kaninchen und anderen Tierarten, das rote Fleisch bei ausdauerndem Schwimmen eine grosse Rolle zu spielen scheint, während das gewöhnliche zu den schnellen Bewegungen in enger Beziehung stehen dürfte.

Die wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen sind:

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Der Cholesteringehalt im gewöhnlichen Fleische von Fischen liegt zwischen 0,035% und 0,077%.
2. Dagegen liegt der im roten Fleische zwischen 0.103% und 0.146%.
3. Die Gesamtphosphormenge beider Fleischarten zeigt in den meisten Fällen nur geringe Unterschiede.
4. Der Trockensubstanzgehalt des roten Fleisches ist höher als der des gewöhnlichen.

LITERATUR.

- Emlden, G. u. Lawaczek, H. (1923): Zs. Physiol. Chem., 125.
 Emlden, G. u. Lawaczek, H. (1920): Zs. physiol. Chem., 104.
 Fex, J. (1920): Biochem. Zs., 104.
 Fiske, C. H. Subbarow, Y. (1925): J. Biolog. Chem., 66.
 Gardner, J. A. u. Fox, F. W. (1924): Biolog. J., 18.
 Hotta, K. (1923): Zs. Physiol. Chem., 125.
 Iijima, J. (1929): Manual of Zoology.
 Kossel, A. u. Obermüller, K. (1890): Zs. Physiol. Chem., 14.
 Kossel, A. u. Krüger, M. (1891): Zs. Physiol. Chem., 15.
 Lawaczek, H. (1923): Zs. Physiol. Chem., 125.
 Okuda, U. (1931): Suisankagaku
 Shaun, E. D. (1914): Zit. n. Murakami, Dobutsugaku-Zasshi, 26.
 The chemical analysis of food in Japan (1931): Report of the imperial government institute for nutrition, 3, No. 1.

The first of these is the fact that the United States is a young nation, and that its history is a history of growth and development.

The second is the fact that the United States is a nation of immigrants, and that its history is a history of the struggle for a better life.

The third is the fact that the United States is a nation of free men, and that its history is a history of the struggle for freedom.

The fourth is the fact that the United States is a nation of peace, and that its history is a history of the struggle for peace.

The fifth is the fact that the United States is a nation of progress, and that its history is a history of the struggle for progress.

The sixth is the fact that the United States is a nation of justice, and that its history is a history of the struggle for justice.

The seventh is the fact that the United States is a nation of hope, and that its history is a history of the struggle for hope.

檢 印



CONTENTS TO VOLUME XVIII.

No. 1, July, 1933.

	Page
TANAKA, Keizo. Über die Sterine des Reisembryos. (II). Ergosterin und Vitamin D	1
TANAKA, Keizo und TANAKA, Toshiyuki. Über die Gallensäurebildung. VI. Reisembryo und Gallensäureausscheidung	15
MUNEMURA, Sammatsu. Beiträge zum Studium der Phosphatasen und über die phosphatatische Hämolyse	23
TANAKA, Toshiyuki. Die Bedeutung der Gallensäure im Kohlehydratstoffwechsel. XXVIII. Glykocholie bei Zufuhr von Ergosterin und seinem Benzoat und das vegetative Nervensystem	33
OKII, Isokiehi. Über den Einfluss der Gallensäure auf den Calciumstoffwechsel. VII. Die Calcium- und Phosphorsäurebilanz der Hündin bei Zufuhr von Gallensäure	45
TAKATA, Hiroshi. Einfluss der Gallensäure auf die enzymatische Spaltung von Lecithin	63
OKUDA, Yuzuru and OGAWA, Masayoshi. On the method of quantitative estimation of glutathione in tissues	75
ICHIHARA, Masao. Über die Phosphamidase	87
HAYASIDA, Atusi. The non-solvent space of the serum and the chlorine bound by the serum protein	107
OHMIYA, Seichi. Über die fermentative Hydrolyse der Hexosidphosphorsäureester	125
KUMON, Teki. Chemie der Gastropodeneier	145
FUJIWARA, Hidekatsu. Über die Farbenreaktionen von Strychnin und Strychninnitrat	153
NAMIKI, Seishiro. Über den Cholesterin-Gehalt der Muskulatur von Fischen	163